

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TRATAMIENTO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ESPLÁCNICA
SECUNDARIA A LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA
EXPERIMENTAL

TESIS DOCTORAL DE:

MANUEL LOSADA RUIZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**MARÍA ÁNGELES ALLER REYERO
CRUZ GARCÍA MARTÍN
ALFREDO ALONSO POZA**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**TRATAMIENTO DE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA ESPLÁCNICA SECUNDARIA A
LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA
EXPERIMENTAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

MANUEL LOSADA RUIZ

Directores

María Ángeles Aller Reyero

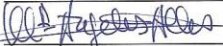

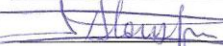
Cruz García Martín

Alfredo Alonso Poza

MADRID, 2013

INFORME DEL DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El trabajo elaborado por D. Manuel Losada Ruiz destaca por su tema de estudio, que intenta resolver una patología hepática grave en el ser humano y que comporta elevada morbi-mortalidad. El objetivo principal, la hipótesis de trabajo, el rigor metodológico y la relevancia de los resultados obtenidos permiten que sea presentado para optar al Grado de Doctor

Fecha	20 de diciembre de 2012	Fecha	20 de diciembre 2012	Fecha	20 de diciembre de 2012
Firma		Firma		Firma	
D.N.I	2519481 S	D.N.I	1480654 Y	D.N.I	12.748.779 V

EVALUADORES ESPECIALISTAS EN LA MATERIA (7)

artº. 4.9 b y 4.9 c de la Normativa de desarrollo del R.D. 1393/2007 (Deberá indicarse cual de los especialistas está incluido en el programa de Doctorado)

Nombre Laureano Lorente Ruigómez	<input checked="" type="checkbox"/> INTERNO	D.N.I 14924549 X
Centro Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid		
Nombre Natalia de las Heras Jimenez		D.N.I
Centro Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid		
Nombre		D.N.I
Centro		

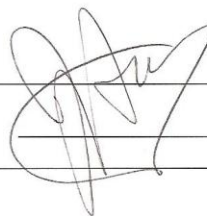
APROBACIÓN DEL ÓRGANO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE POSTGRADO (3)

(Se deberá reflejar la aprobación de la admisión a trámite por el Órgano Responsable del Programa de Postgrado, acompañando a este impreso los informes señalados en el art. 4.6, y los emitidos por los especialistas señalados en el apartado anterior, de acuerdo con la Normativa de Desarrollo de la UCM, del R.D. 1393/2007, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales.

La tesis doctoral con título " Tratamiento de la Respuesta Inflamatoria Esplácica Secundaria a la Colestasis Microquirúrgica Experimental" realizada po D Manuel Losada Ruiz, ha sido considerada por el Consejo de Departamento del 22 de noviembre de 2012, apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha 20/12/12

Firma



A los míos

AGRADECIMIENTOS:

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo:

- Al Prof. Dr. Jaime Arias Pérez, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por su atención instruyéndome en microcirugía y por darme la oportunidad de trabajar junto a él.

- A la Dra. María Ángeles Aller Reyero, Profesora Titular de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.M., por haber aceptado ser codirectora de mi tesis; por su infinita paciencia, sus excelentes indicaciones, su generoso trabajo y constante disposición.

- A María Paz Nava, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Biológicas de la U.C.M., por haberme enseñado el adecuado manejo de los animales y su inestimable ayuda con ellos.

- A mis padres, principales responsables de mi formación, mi profesión y de este trabajo.

- A la Dra. Beatriz Diéquez por haberme estimulado en los momentos en los que era necesario, por su apoyo constante y por su amistad.

- Al Dr. Arturo Cruz por su colaboración en este trabajo y por su amistad.

- A Pedro Cuesta y Santiago Cano, del Centro de Cálculo de la U.C.M., por desarrollar la fase estadística de este estudio.

- Y, por supuesto, a mi mujer y a mi hija, que han soportado mi falta de atención en favor de este trabajo.

- Este trabajo no podría haber sido realidad sin el estudio histopatológico de las muestras que realizó el personal del Dpto. de Anatomía Patológica del Hospital Carlos III de Madrid.

- Este trabajo ha sido parcialmente realizado gracias a la concesión de una beca de ayuda de investigación FISCIAM, ref. n° PI-2007164. También han colaborado en él los laboratorios médicos Covidien Spain s. l. y B. Braun España.

Índice de abreviaturas y acrónimos

A

ABAT: Transportador de ácidos biliares apical dependiente de sodio
ACBIL: Ácidos biliares
ALB: Albúmina
 α 1-AGP: α 1-Glicoproteína ácida
 α 1-MAP: Proteína mayor ácida α 1
ALT: Aspartato Amino Transferasa
AST: Alanina Amino Transferasa
ATP: Adenosín trifosfato

B

BD: Bilirrubina directa
SB: Sales biliares
BSEP: Bomba exportadora de sales biliares
BT: Bilirrubina total

C

CCER: Circulación colateral portosistémica esplenorrenal
CCPE: Circulación colateral portosistémica paraesofágica
CCPR: Circulación colateral portosistémica pararectal
CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CK: Citoqueratina
CLMS: Complejo linfático mesentérico superior
CMQ: colestasis microquirúrgica extrahepática
COX: Citocromo C oxidasa
CREAT: Creatinina
CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

D

DE: Desviación estándar

E

EGF: Factor de crecimiento epidérmico
eNOS: óxido nítrico sintasa-endotelial

ELISA: Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
EP: Espacio porta
ERi: Circulación colateral portosistémica esplenorrenal inferior
ERK: Quinasa extracelular regulada

F

FAI: Fosfatasa Alcalina

G

GAG_s: Glicosaminoglicanos
 γ GT : γ glutamiltransferasa

H

HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HGF: Factor de crecimiento hepatocitario
HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia
HMGB1: Proteína del Grupo de Alta Movilidad Box1

I

IF γ : Interferón γ
IGF: Factor de crecimiento similar a Insulina
IL-10: Interleuquina 10
IL-1 β : Interleuquina 1 β
IL-4: Interleuquina-4
 Δ PC: Incremento del peso corporal

J

JNK: c-Jun N- terminal quinasa

K

KTF: Ketotifén

L

LBP: Proteína de unión a lipopolisacárido

LC: Lóbulo caudado del hígado
LDH: Lactato deshidrogenasa
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LLD: Lóbulo lateral derecho del hígado
LLI: Lóbulo lateral izquierdo del hígado
LM: Lóbulo medio del hígado
LPS: Lipopolisacárido

M

MAP: Proteína activadora mitógena
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos
MDC: quimioquina derivada de macrófagos
MDR3: Glicoproteína de resistencia a multifármacos 3
MIF: Factor inductor de macrófagos
MMPs: Metaloproteinasas de la matriz
MRP2: Proteína asociada a resistencia a multifármacos

N

NADP: Nicotinamida dinucleido fosfato
NADPH: Nicotinamida dinucleido fosfato reducido
NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa B
NGF: Factor de crecimiento nervioso
NO: Óxido nítrico
NTCP: Polipéptido co-transportador de taurocolato sódico

O

OATP_s: Proteína transportadora de aniones orgánicos

P

PAF: Factor de agregación plaquetaria
PAR 2: Receptor proteinasa activado tipo 2

PCF: Peso corporal final
PCI: Peso corporal inicial
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PC: Peso corporal
PE: Peso esplénico
PH: Peso hepático
PI3K: Fosfoinositido-3-quinasa
PKC: Proteinquinasa C
PLLAA: Peso de los lóbulos hepáticos anteriores
PLLPP: Peso de los lóbulos hepáticos posteriores
P.O: Postoperatorio
PR: Peso renal
PSO: Ratas pseudo-operadas
PT: Proteínas totales
PTT: Peso testicular

R

RANTES: Regulated on activation of normal T cells-expressed and secreted protein
RMCP-II : Proteasa de células cebadas de rata tipo II
ROS: Especies reactivas de oxígeno

S

SMA- α : α -actina de músculo liso

T

TGF- β : Factor de crecimiento transformador beta
TIMP: Inhibidores tisulares de metaloproteasas de la matriz.
TLR: Receptor Toll-like
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

V

VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular

X

\bar{x} : media aritmética

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
1. COLESTASIS	1
2. ANATOMÍA DE LA VÍA BILIAR EN LA RATA	5
3. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL	6
4. FISIOPATOLOGÍA DE LA COLESTASIS	10
5. LAS CELULAS CEBADAS COMO MEDIADORAS DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS	19
6. KETOTIFÉN: UN FÁRMACO ESTABILIZADOR DE LAS CÉLULAS CEBADAS	31
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
III. MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. MATERIAL	39
1.A. ANIMALES	39
1.B. INSTALACIONES	40
1.B.1. Animalario	40
1.B.2. Unidad de Microcirugía	40
1.B.3. Sala de sacrificio y procesamiento de muestras	41
1.B.4. Área de conservación de muestras	41
1.B.5. Eliminación de residuos biológicos	41
1.C. FÁRMACOS	42
1.C.1. Anestésicos	42
1.C.2. Ketotifén	42

1.C.3. Otros fármacos	42
1.D.MATERIAL	42
1.D.1. Instrumental quirúrgico	42
1.D.1.A. Pinzas	42
1.D.1.B. Porta-agujas	43
1.D.1.C. Tijeras	43
1.D.2. Material de sutura y ligadura	43
1.D.3. Material quirúrgico complementario	43
1.D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras	43
1.D.5. Material de laboratorio	44
1.E.EQUIPOS DE LABORATORIO	45
1.E.1. Procesado de muestras	45
1.E.2. Estudio bioquímico en suero	45
1.E.3. Determinación de los niveles de mediadores inflamatorios en hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos	45
1.E.4. Laboratorio de anatomía patológica	45
1. Laboratorio general	45
2. Laboratorio de análisis de imagen	46
1. F. REACTIVOS DE LABORATORIO	47
1.F.1. Estudios bioquímicos en suero	47
1.F.2. Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (<i>calcitonin gen related peptide, CGRP</i>) e interleuquina 13 (IL-13) en líquido ascítico	49
1.F.3. Niveles de citoquinas en hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos	49

1.F.4. Reactivos para estudio histológico	50
2. MÉTODOS	51
2.A. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS ANIMALES	51
2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL	51
2. C. TÉCNICA ANESTÉSICA	52
2.D. TÉCNICA QUIRÚRGICA DE PSEUDO-OPERACIÓN	53
2.E. TÉCNICA DE COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXTRAHEPÁTICA	54
2.F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO	59
2.G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES	61
2.G.1. Determinación de la presión venosa portal	61
2.G.2. Circulación venosa colateral	62
2.G.3. Vasculopatía venosa mesentérica	64
2.G.4. Presencia de ascitis y valoración de los niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (<i>Calcitonin Gen Related Peptide</i> , CGRP) e interleuquina 13 (IL-13) en el líquido ascítico	66
2.G.5. Extracción sanguínea	66
2.G.6. Recogida de muestras histológicas para determinación de mediadores inflamatorios	67
2.G.7. Recogida de muestras para estudio histopatológico	68
2.H. DETERMINACIÓN SÉRICA DE PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA	68

2.H.1. Bilirrubina total y directa	68
2.H.2. Transaminasas hepáticas	69
2.H.3. Fosfatasa alcalina	69
2.H.4. γ - glutamil-transferasa	70
2.H.5. Lactato deshidrogenasa	70
2.H.6. Ácidos biliares	70
2.H.7. Proteínas totales	71
2.H.8. Albúmina	71
2.H.9. Creatinina	71
2.H.10. Urea	72
2.I. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN HÍGADO, ÍLEON Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS	72
2.I.1 Homogeneización de los tejidos	72
2.I.2. Valoración de los niveles tisulares de citoquinas	73
2.I.3. Determinación de los niveles tisulares de proteínas	73
2.J. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO	74
2.J.1 Fijación	74
2.J.2. Inclusión	75
2.J.3. Procesado de los cortes	75
2.J.4. Tinción y montaje	76
2.J.4.a. Hematoxilina-Eosina	76
2.J.4.b. Tricrómico de Masson	76
2.J.5. Estudio histomorfométrico de fibrosis en el parénquima hepático con tinción de rojo sirio	77

2.K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	78
IV. RESULTADOS	79
1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS	79
1.A. Supervivencia	79
1.B. Complicaciones postoperatorias	79
1.C. Hallazgos macroscópicos en la necropsia	79
2. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL	81
3. PESO HEPÁTICO	84
4. PESO ESPLÉNICO	92
5. PESO TESTICULAR	96
6. PRESIÓN PORTAL	100
7. CIRCULACIÓN COLATERAL VENOSA PORTOSISTÉMICA	101
8. VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA	106
9. ASCITIS Y CONCENTRACIONES DE PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP) Y DE INTERLEUQUINA-13 (IL-13) EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO	109
9.A. Presencia de ascitis	109
9.B. Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en líquido ascítico	110
9.C. Niveles de interleuquina 13 (IL 13) en líquido ascítico	112
10.DETERMINACIÓN SÉRICA DE MARCADORES DE FUNCIÓN HEPATO-BILIAR	113
11.HISTOPATOLOGÍA HEPÁTICA	138

11.A. Alteraciones histopatológicas hepáticas	138
11.B. Medición de la fibrosis hepática mediante tinción con Rojo Sirio	139
12. CONCENTRACIONES TISULARES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS	141
12. A. MEDIADORES DE OXIDACION	141
12.A.1. Niveles tisulares de catalasa	141
12.A.2. Niveles tisulares de glutathion transferasa	143
12.A.3. Niveles tisulares de glutathion peroxidasa	146
12.B. QUIMIOQUINAS	149
12.B.1. Niveles tisulares de proteína quimioatrayente de macrófagos	149
12.C. CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS	152
12. C.1. Niveles tisulares de interleuquina-1beta (IL-1 β)	152
12.C.2. Niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa	156
12.C.3. Niveles tisulares de interleuquina 13 (IL-13)	160
12.C.4. Niveles tisulares de inteleuquina 17A (IL-17A)	163
12.D. CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS	166
12.D.1. Niveles tisulares de interleuquina-4	166
12.D.2. Niveles tisulares de interleuquina-10	170
13. CONCENTRACIONES TISULARES DE FACTORES DE CRECIMIENTO	173

13.A. Niveles tisulares de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)	173
13.B. Niveles tisulares de factor de crecimiento transformador beta 1 (TGF β -1)	177
V. DISCUSIÓN	180
VI. CONCLUSIONES	203
VII. BIBLIOGRAFÍA	205

RESUMEN

Introducción: La colestasis extrahepática es una de las causas de patología inflamatoria fibrogénica en el hígado. Entre las células implicadas en esta patología destacan las células cebadas que mediante sus mediadores proinflamatorios estimulan las células estrelladas hepáticas que adoptan un fenotipo miofibroblástico y por tanto generan fibrosis. Entre los modelos experimentales descritos en la rata para el estudio de la colestasis extrahepática se deben considerar los que se fundamentan en la obstrucción del colédoco por técnicas macroquirúrgicas. Sin embargo las complicaciones infecciosas inherentes a estos modelos obliga a utilizar como alternativa válida el modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática.

Objetivos: El tratamiento con ketotifén, un fármaco anti-inflamatorio estabilizador de células cebadas, que inhibe la síntesis y liberación de sus mediadores inflamatorios, en dicho modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata, al inhibir la degranulación de las células cebadas, disminuiría la liberación hepato-intestinal de mediadores inflamatorios y profibrogénicos, reduciendo la respuesta inflamatoria esplácnica y por tanto la fibrosis biliar.

Material y Métodos: Para demostrar ésta hipótesis se han utilizado ratas Wistar pseudo-operadas (PSO; n=15) y con colestasis extrahepática microquirúrgica (CMQ; n=20) a las 8-9 semanas de evolución post-operatoria, en las cuales se ha estudiado la presencia de ascitis, vasculopatía venosa mesentérica, hipertensión portal y el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica. Se cuantificaron las concentraciones séricas de parámetros de función hepato-biliar por fotolorimetría, así como los niveles de mediadores pro- y anti-inflamatorios en el ileon terminal, los ganglios linfáticos mesentéricos y el hígado mediante técnicas de inmunoensayo enzimático (*ELISA*). Por último, se realizó un estudio histopatológico hepático y tinción de rojo sirio para cuantificar el área de fibrosis hepática. Los mismos parámetros se evaluaron en ratas PSO (n=20) y en ratas con CMQ (n=20) que se sacrificaron a las 6 semanas de la intervención y en un tercer grupo de ratas PSO (n= 15) y CMQ (n=14) a las

que se administró ketotifén (10 mg/kg/día; v.o.) desde la sexta semana postoperatoria hasta su sacrificio a las 8-9 semanas.

Resultados: Las ratas con colestasis, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas de p.o., mostraron ascitis, aumento de la presión portal ($p<0.001$), vasculopatía venosa mesentérica y desarrollo de circulación colateral porto-sistémica con menor aumento de peso corporal ($p<0.001$), hepato-esplenomegalia ($p<0.001$) y atrofia testicular ($p<0.001$). Además, en las ratas colestásicas se observó hiperbilirrubinemia ($p<0.001$), y aumento de la fosfatasa alcalina ($p<0.001$), gamma-glutamyltranspeptidasa ($p<0.001$), ácidos biliares ($p<0.001$), aspartato-aminotransferasa ($p<0.001$), colesterol ($p<0.001$) y lipoproteínas de alta ($p<0.001$), baja ($p<0.001$) y muy baja densidad ($p<0.001$), respecto de las ratas pseudo-operadas. Asimismo, se demostró hipoproteinemia ($p<0.001$), hipoalbuminemia ($p<0.001$) y aumento de los niveles de creatinina ($p<0.001$).

Respecto de la respuesta inflamatoria esplácnica, en las ratas con colestasis los niveles de catalasa aumentaron en el íleon ($p<0.01$) y disminuyeron en los ganglios linfáticos mesentéricos, glutathione-transferasa y glutathione-peroxidase disminuyeron en el hígado ($p<0.001$) y en los ganglios linfáticos mesentéricos. La proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-1) aumentó en el hígado ($p<0.001$), en el íleon ($p<0.001$), y en los ganglios mesentéricos ($p<0.01$). TNF- α e IL-1 β disminuyeron en el hígado ($p<0.001$), pero mientras TNF- α aumentó progresivamente (desde las 6 a las 8-9 semanas del p.o.) en el íleon ($p<0.05$), IL-1 β disminuyó ($p<0.001$). Ambas citoquinas proinflamatorias aumentaron en los ganglios linfáticos mesentéricos ($p<0.05$). IL-10 aumentó en el íleon ($p<0.05$) y disminuyó en el hígado ($p<0.001$), IL-4 disminuyó en el hígado ($p<0.01$) y aumentó en el íleon ($p<0.001$) y en los ganglios linfáticos mesentéricos. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformador beta (TGF β) disminuyeron tanto en hígado como en íleon, mientras que VEGF aumentó en el íleon. Ambos factores de crecimiento aumentaron en los ganglios del mesenterio. En el estudio histopatológico hepático de las ratas colestásicas se observó necrosis y

apoptosis hepatocitaria asociado a una intensa proliferación epitelial biliar y fibrosis ($p<0.001$).

El tratamiento con ketotifén a las ratas con colestasis aumenta el peso corporal ($p<0.01$), reduce la ascitis, así como la concentración ($p<0.001$) de IL-13 y de CGRP en el líquido ascítico, la esplenomegalia ($p<0.001$), la atrofia testicular ($p<0.01$) y el desarrollo de circulación venosa colateral y de vasculopatía venosa mesentérica. Además, la administración de ketotifén consigue reducir el índice sérico de AST/ALT ($p<0.001$), de LDH ($p<0.01$) y de creatinina ($p<0.001$); en tanto que aumentó los niveles séricos de proteínas totales ($p<0.05$) y de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Respecto de las concentraciones de mediadores inflamatorios en el área esplácnica, ketotifén disminuye ($p<0.001$) los niveles de MCP-1 en el hígado, en el íleon y en los ganglios linfáticos mesentéricos; también reduce TNF- α en el íleon y en los ganglios linfáticos mesentéricos e IL-4, IL-13 e IL-17A en el hígado ($p<0.01$). Por último, ketotifén disminuye ($p<0.001$) VEGF en todos los órganos esplácnicos estudiados, en tanto que sólo consigue reducir las concentraciones de TGF- β 1 en el hígado ($p<0.05$) y en el íleon.

Conclusión: Los resultados obtenidos sugieren que la respuesta inflamatoria esplácnica mediada por células cebadas constituye un importante factor patogénico en la producción de patología hepática secundaria a colestasis extrahepática y por esta razón el tratamiento antiinflamatorio con ketotifén permitiría disminuir las manifestaciones clínicas así como la concentración esplácnica de diferentes mediadores proinflamatorios, en su mayoría producidos por las células cebadas, que están implicados en la fibrogénesis hepática. La importancia de este trabajo de investigación se fundamentaría en que sus resultados permiten un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la producción de la cirrosis hepática, cuya inaceptable morbi-mortalidad en la clínica humana constituye un reto en la actualidad.

Palabras clave: colestasis, microcirugía, hipertensión portal, ascitis, inflamación, fibrosis, cirrosis, células cebadas, ketotifén.

SUMMARY

Introduction: Extrahepatic cholestasis is one of the causes of the liver fibrogenesis. Mast cells are the primary cells involved in this pathology, through which its pro-inflammatory mediators stimulate hepatic stellate cells that adopt a miofibroblastic phenotype, leading to the development of fibrosis. There are diverse experimental models described in the rat for the study of extrahepatic cholestasis, and those based on the obstruction of the bile duct using macrosurgical techniques should be considered. However, the infectious complications inherent to these models require using valid alternative microsurgical extrahepatic cholestasis models.

Objectives: Treatment with Ketotifen, an anti-inflammatory mast cell stabilizer that inhibits the synthesis and release of its inflammatory mediators, which inhibits the degranulation of mast cells in the above-mentioned microsurgical extrahepatic cholestasis model in the rat, would reduce the hepatic-intestinal release of inflammatory and profibrogenic mediators, thus reducing the splanchnic inflammatory response and consequently biliary fibrosis.

Material and Methods: Sham-operated Wister rats (PSO; n=15) and rats with microsurgical extrahepatic cholestasis (CMQ; n=20) at 8-9 weeks of post-operative evolution were used to demonstrate this hypothesis. The presence of ascites, mesenteric venous vasculopathy, portal hypertension and the development of a portosystemic collateral circulation were studied. The serum concentration parameters of the hepatobiliary function were quantified by photocolormetrics, and the levels of the pro- and anti-inflammatory mediators in the terminal ileum, the mesenteric lymph glands and the liver were quantified by enzyme immunoassay (ELISA). Lastly, a hepatic histopathological study and sirius red staining study was performed to quantify the area of liver fibrosis. The same parameters were assessed in sham-operated rats (n=20) and rats with microsurgical extrahepatic cholestasis (n=20), which were sacrificed at 6 weeks post-operation and in a third group of sham-operated rats (n= 15) and rats with microsurgical

extrahepatic cholestasis (n=14), which were administered (10 mg/kg/día; v.o.) from the sixth week after the operation until sacrificed at 8-9 weeks.

Results: Rats with cholestasis, at 6 weeks and 8-9 weeks post-operation, showed ascites, an increase in portal tension ($p<0.001$), mesenteric venous vasculopathy and the development of portosystemic collateral circulation with a lesser increase of body weight ($p<0.001$), hepatic splenomegaly ($p<0.001$) and testicular atrophy ($p<0.001$). Also, observed in the cholestatic rats were hyperbilirubinemia ($p<0.001$) and an increase in alkaline phosphatase ($p<0.001$), gamma-glutamyltranspeptidase ($p<0.001$), bile acids ($p<0.001$), aspartate aminotransferase ($p<0.001$), cholesterol ($p<0.001$) as well as high ($p<0.001$), low ($p<0.001$) and very low density lipoproteins ($p<0.001$), compared to sham-operated rats. Likewise, hypoproteinemia ($p<0.001$), hypoalbuminemia ($p<0.001$) and an increase in creatinine levels were shown ($p<0.001$).

In terms of the splanchnic inflammatory response, in the cholestatic rats, the levels of catalase increased in the ileum ($p<0.01$) and were reduced in the mesenteric lymph gland, while glutathione-transferase and glutathione-peroxidase reduced in the liver and ($p<0.001$) mesenteric lymph glands. Macrophage chemotactic proteins (MCP-1) increased in the liver ($p<0.001$), in the ileum ($p<0.001$), and the mesenteric glands ($p<0.01$). TNF- α and IL-1 β reduced in the liver ($p<0.001$), while TNF- α progressively increased (from 8-9 weeks post-operation) in the ileum ($p<0.05$), IL-1 β reduced ($p<0.001$). Both pro-inflammatory cytokines in the mesenteric lymph glands increased ($p<0.05$). IL-10 increased in the ileum ($p<0.05$) and reduced in the liver ($p<0.001$), IL-4 reduced in the liver ($p<0.01$) and increased in the ileum ($p<0.001$) and mesenteric lymph glands. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and the transforming growth factor beta (TGF β) reduced in the liver and the ileum while the VEGF increased in the ileum. Both growth factors increased in the mesenteric glands. In the hepatic histopathologic study of cholestatic rats, necrosis and hepatocitary apoptosis were observed secondary to an intense biliary epithelial proliferation and fibrosis.

The treatment of cholestatic rats with Ketotifen increases body weight ($p<0.01$), reduces ascites and the concentration ($p<0.001$) of IL-13 and CGRP in the ascites fluid, splenomegaly ($p<0.001$), testicular atrophy ($p<0.01$) and the collateral venous circulation and mesenteric venous vasculopathy. Also, the administration of Ketotifen achieves reducing the serum indexes of AST/ALT ($p<0.001$), LDH ($p<0.01$) creatinine ($p<0.001$); so much that the serum levels of the overall proteins ($p<0.05$) and high density lipoproteins (HDL) also increased. In terms of the concentrations of inflammatory mediators in the splanchnic area, Ketotifen reduces ($p<0.001$) the levels of MCP-1 in the liver, ileum and the mesenteric lymph glands; it also reduces TNF- α in the ileum and the mesenteric lymph glands and IL-4, IL-13 and IL-17A in the liver ($p<0.01$). Lastly, Ketotifen reduces ($p<0.001$) VEGF in all the splanchnic organs studied, while it also reduces the concentrations of TGF- β 1 in the liver ($p<0.05$) and the ileum.

Conclusion: The results obtained suggest that the splanchnic inflammatory response mediated by mast cells constitutes an important pathological factor in the liver pathology secondary to extrahepatic cholestasis. This is why the Ketotifen anti-inflammatory treatment would reduce clinical manifestations as well as the splanchnic concentration of different pro-inflammatory mediators, which are mostly produced by the mast cells involved in hepatic fibrogenesis. The importance of this research work would be based on the fact that its results allow for acquiring better knowledge of the physiopathological mechanisms involved in the production of liver cirrhosis, and whose unacceptable morbi-mortality rate is a challenge to human clinical practice today.

Key words: cholestasis, microsurgery, hypertension, ascites, inflammations, fibrosis, cirrhosis, mast cells, ketotifen.

I. INTRODUCCIÓN

1. COLESTASIS

Las enfermedades colestásicas hepáticas son consecuencia de trastornos de la síntesis hepatobiliar y de la excreción de la bilis, lo cual comporta la llegada a la circulación sanguínea de productos biliares (Hirschfield y cols, 2010). En estas patologías, la lesión de los conductos biliares o de los hepatocitos puede inducir un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen desde alteraciones aisladas de la bioquímica hepática hasta el fallo hepático o el cáncer hepatobiliar. Las causas del síndrome colestásico pueden ser congénitas, inmunológicas, estructurales –obstructivas/vasculares– y tóxicas (Hirschfield y cols, 2010). Se pueden desarrollar varias formas de colestasis, bien por una alteración de la secreción biliar, por una obstrucción del flujo biliar, o por una combinación de ambas. A su vez, el deterioro en el flujo biliar que conduce a la colestasis puede acontecer de forma aguda o crónica. Como consecuencia se produce una retención de ácidos biliares, bilirrubina y otros solutos colefílicos en el hígado y en la sangre y un déficit de ácidos biliares en el intestino.

Aunque los colangiocitos sólo representan una pequeña proporción (3-5%) de las células que forman el parénquima hepático (Alpini et al., 2001; Hirschfield y cols, 2010), desempeñan un papel fisiopatológico relevante en la composición de la bilis durante su tránsito por la vía biliar, que implica la secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis hepatocelular (Alvaro y cols., 1997; Alpini y cols., 2001; Racanelli and Rehmann, 2006; Glaser y cols. 2006). Los colangiocitos son unas células epiteliales ciliadas que delinean la vía biliar, una intrincada red de conductos biliares interconectados que aumentan progresivamente su diámetro desde los conductos de Hering hasta la vía biliar extrahepática (Alpini y cols., 2002; Lorente L y cols., 2009) (Figura 1).

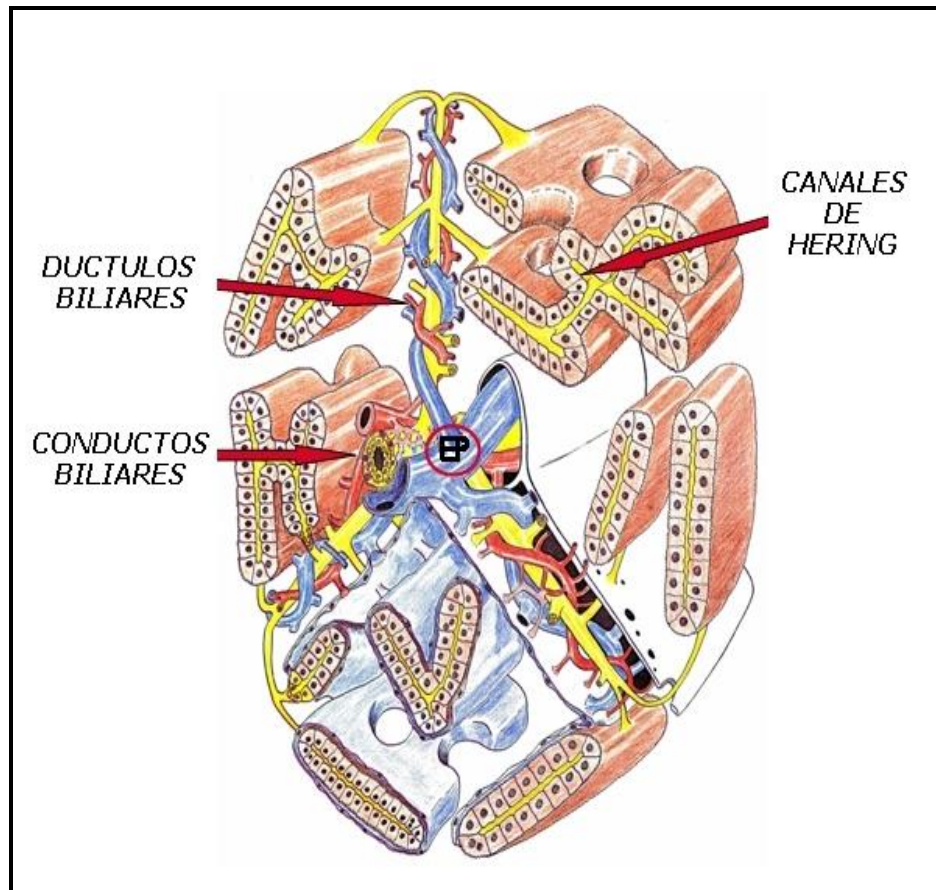


Figura 1. Unidad funcional hepática. Los canalículos biliares drenan en los canales de Hering y estos a su vez en los ductos biliares, que desembocan en los conductos biliares interlobulARES, situados en los espacios porta (EP). (Arias y cols, 1993)

Los colangiocitos de los grandes conductos biliares interlobulARES intervienen fundamentalmente en funciones secretoras, en tanto que los que delimitan los conductos biliares intrahepáticos más pequeños, los colangiolos y los conductos de Hering están implicados en la respuesta inflamatoria y proliferativa (Alpini y cols, 1996; Alpini y cols, 1997). Los cilios de los colangiocitos se extienden desde la membrana plasmática apical hasta la luz del conducto biliar y regulan funciones mecanosensoriales, osmosensoriales y quimiosensoriales (Masyuk y cols., 2006; Masyuk y cols., 2008). La estimulación de los colangiocitos por vías paracrina y endocrina induce la secreción de agua y la alcalinización de la bilis (Srazzabosco y cols, 1991; Kanno y cols., 2001; Esteller, 2008). En éste proceso se integran estímulos prosecretorios (secretina, glucagón, polipéptido intestinal vasoactivo, VIP, acetilcolina, Ach y bombesina) y

antisecretorios (somatostatina y endotelina-1) (Fiorotto y cols., 2007; Minagawa y cols., 2007; Srazzabosco y cols, 2009).

El hepatocito es una célula poligonal polarizada que posee una membrana plasmática con una superficie basolateral, localizada en el espacio de Disse, subyacente a las células endoteliales del sinusoides, y una cara apical que delimita el canalículo biliar (Li y Crawford, 2004). El transporte de proteínas desde la membrana basolateral (sinusoidal) hasta la apical (canalicular) desplaza los ácidos biliares desde la sangre sinusoidal hasta el canalículo biliar mediante una eficiente circulación enterohepática estrechamente regulada (Zollner y Trauner, 2008; Boyer, 2009). La membrana plasmática basolateral contiene proteínas transportadoras que utilizan gradientes de Na^+ y de pH para captar solutos orgánicos desde la sangre hacia el interior del hepatocito. Y la membrana canalicular tiene sistemas de transporte activo que facilitan la secreción de solutos orgánicos hacia la luz canalicular. Receptores nucleares regulan la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en los sistemas de transporte hepatobiliar, de síntesis y detoxificación de ácidos biliares y de fibrogénesis (Fiorucci y cols, 2004; Fickert y cols, 2009; Wagner y cols. 2010). Los ácidos biliares son internalizados a través de la membrana basolateral de los hepatocitos por la proteína cotransportadora de Na^+ /taurocolato y transportadora de aniones orgánicos (*Na^+ /taurocholate cotransporter and organic anion transporting proteins, OATP2/OATPB1*) (Konig y cols., 2006). Los principales solutos orgánicos secretados en la bilis son sales biliares conjugadas con taurina o con glicina (ursodeoxicolato, colato, quenodeoxicolato, deoxicolato y litocolato), fosfatidilcolina, colesterol, glucurónidos de bilirrubina y glutatión (Nathanson y Boyer, 1991; Li y Crawford, 2004). La exportación activa hacia la bilis es mediada por la bomba canalicular exportadora de sales biliares (*canalicular bile SALT export pump, ABCB11*) y por la bomba canalicular exportadora conjugada (*canalicular conjugate export pump; MRP2*). MRP2 regula el transporte canalicular de aniones orgánicos, como la bilirrubina (Nies y Keppler, 2007; Lam, y cols., 2010). Por último, La formación de micelas mixtas en la bilis resulta de la presencia de ácidos biliares, colesterol y fosfatidilcolina y la bomba exportadora de fosfolípidos proteína 3 resistente a multifármacos

(*multi-drug-resistant 3 protein; MDR3*) controla activamente éste proceso (Davit-Spraul y cols., 2010)

Si la etiología de la colestasis es obstructiva, dependiendo del nivel anatómico de la obstrucción, se clasifica en intrahepática y extrahepática. Las causas más frecuentes de colestasis intrahepática en la clínica humana son la colangitis esclerosante, la cirrosis biliar primaria, la atresia biliar y las hepatopatías de etiología alcohólica, vírica, o farmacológica (Trauner y cols. 1998; Rutherford y cols, 2006; O'Leary y cols, 2007; Hirschfield y cols, 2010; Pakarinen y Rintala, 2011; Ramappa y Aithal, 2011), en tanto que la patología litiásica y tumoral predominan en la colestasis extrahepática (Hirschfield y cols, 2010; Ramappa y Aithal, 2011).

Pero, independientemente de cuál sea su causa, este síndrome se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Schaffner y cols. 1979; Sherlock, 1984; Bergasa y cols. 1995a; Bergasa y cols. 1995b; Li y cols. 2004; Bathia y cols, 2006; Heathcote EJ, 2007; Oude Elferink y cols. 2011; Ramappa y Aithal, 2011). Desde el punto de vista bioquímico, la colestasis cursa con niveles séricos elevados de bilirrubina, ácidos biliares, fosfatasa alcalina y γ -glutamyl transferasa e hipercolesterolemia (Li y Crawford, 2004; Shiha y cols. 2009). Finalmente cursa con fibrosis, cirrosis y signos clínicos de insuficiencia hepática y encefalopatía hepática (Boyer y cols 2007; Newton y cols. 2008) Incluso, si la obstrucción es crónica se ha demostrado la evolución tumoral de éste proceso (Xia y cols., 2007; Aller y cols., 2010; Yang y cols., 2011).

En conclusión, la patología derivada de la colestasis incluye aspectos morfológicos: acúmulo o estasis de bilis en la vía biliar y en los hepatocitos; funcionales: disminución de la secreción hepática de bilis y del flujo biliar canalicular; y clínicos: retención en la circulación sanguínea de sustancias que normalmente son excretadas en la bilis (Sherlock, 1997; Li y cols. 2004; Zollner y cols, 2008; Chu y cols., 2010; Hirschfield y cols., 2010; Kremer y col., 2011).

2. ANATOMÍA DE LA VÍA BILIAR EN LA RATA

El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos, denominados medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado (Castaing y cols. 1980; Lorente y cols. 1995, Lorente y cols., 2009) (Figura 2). Además, algunos autores describen el proceso caudado (PC) como el segmento de parénquima comprendido entre los lóbulos caudado y lateral derecho (Aller y cols. 2008; Lorente y cols. 2009).

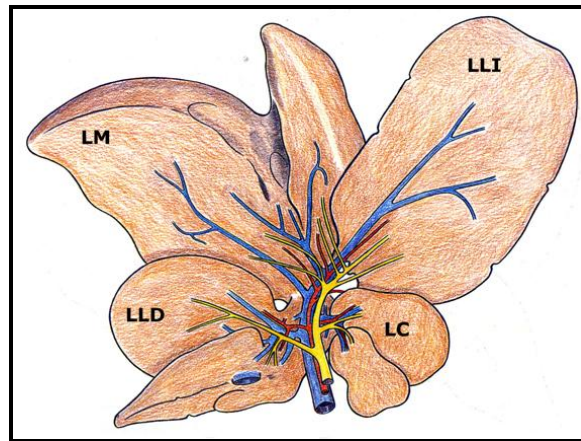


Figura 2. El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado.

La vía biliar tiene una estructura similar a un árbol, en el cual el colédoco y los conductos biliares lobulares corresponderían al tronco que se ramificarían progresivamente en los conductos biliares interlobulares (Figura 3), los dúctulos biliares o canales de Hering y, finalmente los canalículos biliares (Figura1) (Phillips y cols., 1987; Benedetti y cols. 1996; Aller y cols. 2008; Lorente y cols. 2009).

La vía biliar extrahepática en la rata está constituida por el colédoco, que en su trayectoria ascendente recibe en el hilio hepático los siguientes conductos biliares lobulares: conductos inferiores o caudales, correspondientes a los lóbulos caudado y lateral derecho; y conductos

superiores o craneales, correspondientes a los lóbulos lateral izquierdo y medio (Aller et al 2008; Lorente y cols. 2009) (Figura 3).

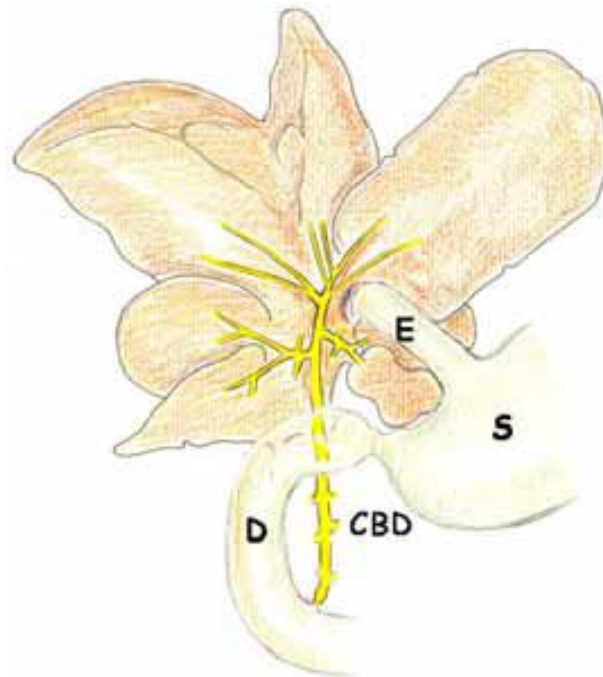


Figura 3. Distribución habitual de los conductos biliares de primer orden en la rata. CBD: Vía biliar principal; E: Esófago; S: Estómago; D: Duodeno.

3. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL

La ictericia obstructiva causa una elevada incidencia de morbi-mortalidad en la clínica humana (O'Connor, 1985; Poupon y cols, 2000). Las severas repercusiones hepáticas y sistémicas de la colestasis (Schaffner y cols. 1979; O'Connor, 1985; Sherlock 1986; Li y cols., 2004; Nguyen y cols., 2010; Chu y cols., 2010; Hirschfield y cols., 2010; Kremer y cols., 2011) han sido la causa de la creación de diversos modelos experimentales que permitan una mejor comprensión de su patogénesis, profilaxis y tratamiento.

La ligadura del colédoco en la rata es un modelo experimental utilizado tanto para el estudio de la hipertensión portal (Katsuta y cols., 2005; Abrales y cols. 2006) como, en especial, de la colestasis extrahepática (Rodríguez-Garay, 2003; Aller y cols, 2009; Aller y cols., 2010). En esencia, la técnica quirúrgica consiste en la resección del colédoco entre dos

ligaduras. Esta técnica es macroquirúrgica, ya que no requiere medios de magnificación para su realización. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica desarrollan un pseudoquiste biliar hiliar por dilatación del extremo proximal ligado del colédoco, que se infecta en muchas ocasiones por microorganismos Gram negativos de procedencia intestinal y los animales fallecen durante las dos primeras semanas de evolución postoperatoria por sepsis secundaria a la existencia de múltiples abscesos intraperitoneales, hepáticos y pulmonares (Aller et al. 1991; Aller et al. 1993, Aller y cols. 2004; Aller et al., 2009a). El cultivo de la bilis almacenada en éstos pseudoquistes hiliares es positivo y los gérmenes más frecuentes *Escherichia coli* y *Enterococcus* (Aller y cols. 2000), lo cual evidencia que en éste modelo experimental se produce traslocación bacteriana intestinal.

Para evitar estas complicaciones infecciosas propusimos la realización de una técnica microquirúrgica consistente en la resección de la vía biliar extrahepática, que incluye el colédoco hasta el inicio de su porción intrapancreática, en continuidad con los conductos biliares que drenan cada uno de los cuatro lóbulos hepáticos en la rata (Aller et al. 1993; Lorente et al. 1995, Aller et al., 2009a, Aller et al., 2009b; Aller y cols., 2010). Con esta técnica microquirúrgica la inexistencia de vía biliar extrahepática residual previene la formación de pseudoquistes biliares hiliares, así como de abscesos abdomino-torácicos y reduce la mortalidad respecto al modelo clásico de ligadura y sección del colédoco (Aller et al. 1993; Aller et al. 2004; Aller et al., 2009a, Aller et al., 2009b; Aller y cols., 2010).

En particular, éste modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, al conseguir mayor supervivencia, permite obtener a largo plazo un nuevo modelo de fibrosis hepática que puede ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. En éste sentido, los dos modelos experimentales más utilizados para estudiar la insuficiencia hepática crónica son la administración de tetracloruro de carbono y la colestasis por ligadura y sección del colédoco (Assimakopoulos y Vagianos, 2009).

En el modelo de colestasis extrahepática en la rata se consideran dos fases evolutivas: precoz, si la colestasis se mantiene cuatro semanas, y

tardío cuando se supera este período postoperatorio (Assimakopoulos y Vagianos, 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático, no existiendo todavía ni hipertensión portal ni cirrosis, si bien induce efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos sobre el corazón (Joubert, 1978; Liu y cols., 2000; Nahavandi y cols. 2001; Mani y cols. 2002; Hajrasouliha y cols. 2004), altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Bomzon y cols., 1985; Jacob y cols., 1993) y causa una intensa diuresis y natriuresis, que pueden incluso desembocar en hipovolemia (Heindenreich y cols. 1987; Green y Better, 1995). Como consecuencia, se producen hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal, que es agravada por la endotoxemia que acompaña a este modelo experimental. Por el contrario, cuando la evolución de la colestasis es crónica (más de cuatro semanas), además de la colemia, la endotoxemia y la traslocación bacteriana intestinal (Deitch y cols., 1990; Clements y cols, 1996; Clements y cols., 1998), se produce una lesión significativa hepática, con cirrosis biliar, hipertensión portal y ascitis (Green y Better, 1995; Geerts y cols., 2008) que se asocia a una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorenal de los enfermos cirróticos. Por éste motivo la colestasis obstructiva extrahepática crónica en la rata se ha propuesto como un modelo experimental valido para el estudio de la fisiopatología y de nuevas opciones terapéuticas en ésta grave situación en la clínica humana (Assimakopoulos y Vagianos, 2009)

En general, la mayoría de estos modelos experimentales han sido utilizados para el estudio de aquellos mecanismos patogénicos implicados en los procesos inflamatorios causantes de diversas patologías. En particular, en el caso del modelo experimental de colestasis, se han estudiado la anatomía de la vía biliar extrahepática en la rata Wistar (Lorente y cols. 1995), la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller y cols. 1993a), la técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática en la rata (Aller et al. 1993b), y, entre las alteraciones hepáticas secundarias a colestasis, los parámetros sanguíneos propios de lesión hepatobiliar, el grado de fibrosis y proliferación biliar (Aller y cols. 2004a; Aller y cols. 2004b) y el metabolismo oxidativo hepato-intestinal (López y cols. 2001) y cerebral (García-Moreno y cols., 2002).

Esta técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática puede ser también realizada en el ratón (Aller y cols. 2009a; Aller y cols. 2009b). El hígado del ratón, al igual que el de la rata, está compuesto por cuatro lóbulos que reciben los mismos nombres. La principal diferencia en la vía biliar de ambos roedores es que el ratón posee vesícula biliar. Por ello, si se efectúa ligadura del colédoco se produce una marcada dilatación de la vesícula biliar que puede evolucionar a perforación y coleperitoneo (Abralles y cols. 2006). Por ello la colestasis extrahepática microquirúrgica en el ratón precisa añadir una colecistectomía. La disección, ligadura y sección de los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo se simplifica si se realiza previamente la disección de la vesícula biliar y del conducto cístico (Aller y cols. 2009a; Aller y cols. 2009b).

La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (ceftacidima 50mg/kg) y la administración semanal de vitamina K1 (8 mg/kg i.m.) permite reducir la mortalidad precoz de éstos animales (Beck y Lee, 1995; Huan y cols. 2003; Akimoto y cols, 2005; Abralles y cols. 2006).

A largo plazo, ambos modelos de colestasis extrahepática, macro y microquirúrgica, cursan con hepatomegalia asociada al desarrollo de una intensa fibrosis y proliferación biliar, fibrosis y de un moderado grado de infiltración inflamatoria portal, así como de muerte hepatocitaria por necrosis y/o apoptosis, si bien la pérdida de la arquitectura hepática normal típica de cirrosis se observa en raras ocasiones (Kountouras y cols. 1984; Aller y cols. 1993; Aller y cols. 2004; Abralles y cols. 2006).

Respecto de las alteraciones extrahepáticas destacan la ictericia, la coluria (Huang y cols. 2003; Aller y cols. 2004), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller y cols. 1993; Huang y cols. 2003; Aller y cols. 2004; Chan y cols. 2004; Katsuta y cols. 2005), la insuficiencia renal (Assimakopoulos y Vagianos, 2009) la encefalopatía hepática (Bergasa y cols., 1992; García-Moreno y cols. 2002; García-Moreno y cols. 2005; Butterworth y cols., 2009; Huang y cols. 2010; Magen y cols. 2010; Assimakopoulos y cols. 2010; Eslimi y cols. 2011) y la ascitis (Huang y cols. 2003; Aller y cols., 2010a; Aller y cols.

2010b). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no es sólo un modelo idóneo para estudiar la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino también sus complicaciones extrahepáticas.

4. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS

Las alteraciones hepáticas que se producen como consecuencia de la colestasis extrahepática han sido comparadas a las que protagonizan la curación de las heridas, esto es, la proliferación epitelial y, en particular, la fibrogénesis (Bissell, 2004; Aller y cols., 2008; Meran y Steadman; 2011). La patogenia de la fibrosis hepática consiste en un depósito excesivo de colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular que distorsiona la arquitectura hepática e induce capilarización sinusoidal e hipertensión portal. En esencia, la fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular aberrante en el que los fenómenos claves son la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas quiescentes en células similares a miofibroblastos, por un proceso de transición epitelio-mesenquimal de tipo 2, con el subsiguiente incremento en la síntesis de proteínas, como actina de musculo liso- α , de colágeno, metaloproteasas de la matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas y proteoglicanos (Mormone y cols., 2011; Meran y Steadman, 2011; Fragiadaki y Mason, 2011).

Inmediatamente después de la obstrucción completa de la vía biliar en la rata se produce un intenso incremento (60%) de la presión biliar intraductal (Slott y cols. 1990; Azmaiparashvili y cols. 2009) y esto es seguido por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere y cols. 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Ramm y cols. 2000; Matsumoto y cols., 2002; Costa y cols. 2003; Kirkland y cols. 2010). Estos estudios demuestran la relevancia de la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

La respuesta del hígado de los roedores a la lesión obstructiva biliar implica su reprogramación transcripcional, favoreciendo la activación de genes reguladores del metabolismo, de la proliferación celular y de la remodelación de la matriz de forma secuencial y limitada en el tiempo (Campbell y cols. 2004; Wang y cols. 2005). Aunque se produce una activación predominante de genes metabólicos en todas las fases posteriores a la ligadura del colédoco, desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días), la afectación de vías metabólicas específicas es diferente dependiendo de la duración de la obstrucción (Campbell y cols. 2004). En tanto que algunos genes son activados en el periodo precoz de la colestasis, por ejemplo genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis, otros genes, como son los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima y cols. 2004).

Después de la ligadura del colédoco el hígado de la rata sufre severas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo (Huang y cols. 2009; Yang y cols. 2012; Oguz y cols., 2012). El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Ohara y cols. 1993; Li y Yang, 2005; Van Steenkiste y cols. 2010) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria del enzima óxido nítrico sintasa-inducible (eNOS) y de óxido nítrico (NO) (Barón y cols. 2000; Lee y cols., 2010).

La vía biliar es vascularizada por el plexo peribiliar (Gaudio y cols. 1996; Li y cols. 2007; Toki y cols. 2011), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose así progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio y cols. 1996). Estas características del plexo peribiliar permiten asumir que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar en la colestasis extrahepática podría comprimir el plexo peribiliar con la consiguiente isquemia de la vía biliar. Sin embargo, se ha descrito que después de la disminución del flujo sanguíneo a través de la vena porta se produce un aumento del flujo arterial hepático o "*hepatic arterial buffer response*" (Lau, 1983). Además, dos semanas después de ligadura del colédoco en la rata se produce una proliferación

significativa del plexo peribiliar, que drena por pequeñas vénulas en ramas de la vena porta y en los sinusoides hepáticos (Gaudio y cols. 1996). A su vez, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Tanaka y cols. 2006; Toki y cols., 2011).

Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos que son considerados la causa principal de hepatotoxicidad (Gartung y cols., 1996; Poli, 2000). Además, se produce un deterioro parcial de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales y estrés oxidativo (Poli, 2000; Huang y cols. 2003). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxicolato) puede inhibir la actividad antioxidante hepática de catalasa, glutathion peroxidasa, glutathion reducido y superóxido dismutasa, así como inducir necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Orellana y cols. 1997; Wang y cols. 2007; Portincasa y cols. 2007; Assimakopoulos, 2007; Arduini y cols. 2011). Existe por tanto una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Orellana y cols. 1997; Assimakopoulos y cols. 2004; Wang y cols. 2007). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos y cols. 2004; Soylyu y cols. 2006), y las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soylyu y cols. 2006; Assimakopoulos y cols. 2007; Portincasa y cols. 2007; Tahang y cols. 2007).

Por consiguiente, en la fase precoz tras ligadura del colédoco en la rata el insuficiente aporte de oxígeno que sufre el hígado, como consecuencia de las alteraciones hemodinámicas, así como a la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las sales biliares, constituirían factores etiológicos esenciales de la inhibición del metabolismo energético hepático. Como consecuencia, el hígado reduce su capacidad funcional para poder satisfacer las necesidades metabólicas tisulares. La lesión oxidativa hepática podría disminuir el contenido intracelular de proteínas que participan en la síntesis energética y en las funciones de

membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de H₂O e iones (Portincasa y cols. 2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. Además, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa y cols. 2007), puede relacionarse con el aumento de la permeabilidad de membrana, el aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y el edema (Kennett y Davies, 2007).

La acumulación intersticial de fragmentos de glicosaminoglicanos (GAGs) sería un importante mecanismo de la formación del edema debido a las propiedades hidrofílicas de GAGs, en particular de hialuronan (Day y de la Motte, 2005; Cantor y Nadkarni, 2006; Stein y cols. 2006; Kennett y Davies, 2007; Yung y Chan 2007; Bartlett y cols. 2007; Jiang y cols. 2007). GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral, muy extendidas y que ocupan un gran volumen en relación con su masa. Estos polisacáridos atraen y atrapan agua e iones, con lo cual forman geles hidratados, aunque permiten el flujo a su través de nutrientes para las células (Alberts y cols. 1983; Rodees y Simons, 2007; Jiang y cols. 2007; Solís-Herruzo y cols., 2011). En situaciones de inflamación hialuronan es más polidisperso y tiende a formas de menor peso molecular, favoreciendo así la infiltración edematosa de los tejidos (Jiang y cols. 2007), el flujo del líquido intersticial y el gradiente de presión del sistema linfático (Chen y Fu, 2005).

Además, la tensión mecánica producida por la ligadura del colédoco puede alterar por mecanotransducción la remodelación de los proteoglicanos y de GAGs en el intersticio (Evanko y cols. 2007). Virtualmente todos los órganos y tejidos están organizados en jerarquías estructurales y poseen una capacidad de respuesta mecánica inmediata aumentando su rigidez en proporción directa al estrés mecánico aplicado (Ingber, 2006). La rigidez de la matriz extracelular y la tensión mecánica que resulta de la adhesión celular a sustratos rígidos es fundamental para determinar el fenotipo expresado por muchas células en cultivo (Bischofs y Schwarz, 2003).

En el modelo de fibrosis biliar por CCl_4 en la rata se ha descrito la inducción precoz de rigidez hepática. Este aumento de la consistencia y/o rigidez hepática parece ser el resultado del aumento de la cantidad de matriz neoformada, de la reticulación de la matriz y, posiblemente de otras variables desconocidas (Georges y cols. 2007). Este aumento precoz en la rigidez hepática podría ser la causa de la diferenciación de los miofibroblastos en las patologías hepáticas (Georges y cols. 2007; Muddu y cols. 2007). La expresión de la función miofibroblasto aporta a las células estrelladas hepáticas activadas la capacidad para comportarse como células musculares lisas y, por consiguiente, responden a las sustancias vasoactivas contrayéndose (Lee y Friedman, 2011). Además, la contracción de las células estrelladas activadas regula el diámetro de la vascularización hepática y altera el flujo sanguíneo y la presión hepática (Winaw y cols. 2008).

La adquisición posterior en la evolución del hígado colestásico de un fenotipo inmune afecta a las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos), a las no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y miofibroblastos) y a las células sanguíneas que migran al intersticio hepático (Azouz y cols. 2004; Morwood y Nicholson, 2006; Szabo y cols. 2007; Muddu y cols. 2007; Winaw y cols. 2008). Sin embargo, el espacio intersticial parece ser el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata (Aller y cols, 2008). En particular, los fragmentos de matriz extracelular y sus receptores ejercen importantes efectos sobre las células inflamatorias y, por ello, se considera que están claramente implicados en la evolución de la respuesta inmune intersticial (Morwood y Nicholson, 2006; Adair-Kirk y Señor, 2007; Yung y Chan 2007). Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular que son expresadas en los tejidos inflamados (Cuenca y cols. 2006; Malemud, 2006; Zitka y cols., 2010; Löffek y cols., 2011;) y, en particular, en el hígado colestásico (Roelo y cols. 1997; Harty y cols. 2005; Bergheim y cols. 2006). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz (Stern y cols. 2006; Yung y Chan, 2007).

Los fragmentos de la matriz extracelular están constituidos por moléculas con funciones proinflamatorias que pueden potenciar la respuesta inmune activando la respuesta inmune innata y la adquirida (Morwood y Nicholson, 2006). Así, las proteínas de la matriz extracelular y el hialuronan ejercen una función proinflamatoria uniéndose a los receptores *Toll-like* TLR-4 y TLR-2 (Szabo y cols. 2007), con activación del complejo regulador transcripcional NF κ B/I κ B α y la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , y de quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Morwood y Nicholson, 2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas (Zhu y cols., 2010; Yagi y cols., 2011). El tipo 1 (Th₁) sintetiza interferón γ (IFN- γ) e IL-2 y, los de tipo 2 (Th₂) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas Th₂ están implicadas fundamentalmente en la mediación de la inflamación alérgica y los trastornos fibroproliferativos crónicos (Azouz y cols. 2004).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y, debido a su localización, podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión secundaria a isquemia-reperfusión (Kolios y cols. 2006; Abu-Amara y cols, 2010; Jaeschke y cols., 2012). Pero las células de Kupffer están también implicadas en la inflamación hepática que produce la colestasis mediante la liberación de sustancias biológicamente activas que inducen un proceso inmunopatogénico (Minter y cols. 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter y cols. 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011) y muestran una activación de la fagocitosis y una marcada respuesta proinflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión a lipopolisacárido (*lipopolysaccharide-binding protein*, LBP), ambas aumentadas en colestasis extrahepática (O'Neil y cols. 1997; Minter y cols. 2005; Kolios y cols. 2006; Isayama y cols. 2006; Minter y cols., 2008; Kassel y cols., 2011). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del

aumento de la peroxidación lipídica (Harry y cols. 1999; Isayama y cols. 2006; Abrahám y cols., 2008), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam y cols. 2002; Iida y cols., 2010). Sin embargo, la depleción de células de Kupffer agrava la inflamación y la necrosis hepatocelular en ratones con colestasis (Gehring y cols. 2006). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS en ratas con ligadura de colédoco es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que, a su vez, inhibe las vías proinflamatorias hepáticas, restaura la actividad de eNOS y reduce la presión portal (Thabut y cols. 2007).

La inflamación se asocia siempre a la infiltración intersticial por leucocitos, un proceso que es regulado por quimioquinas (Aller y cols. 2006; Manovani y cols., 2011). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioattractora de monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1), una quimioquina CC y, como resultado éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Imamura y cols. 2005; Sigal y cols., 2010). Además, la colestasis extrahepática estimula la síntesis de quimioquinas CXC que son, en parte, responsables de la infiltración de los tractos portales por neutrófilos (Saito y cols. 2000; Gujral y cols. 2003; Patsenker y cols., 2008; Aller y cols 2010a).

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Shivakumar y cols. 2004; Laschke y cols., 2010; Jaeschke 2011). En la colestasis extrahepática experimental la infiltración intersticial por neutrófilos ocurre ya a los tres días de la ligadura del colédoco (Levy y cols. 1993; Gujral y cols. 2003; Georgiev y cols. 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo quimioattractantes de neutrófilos (Saito y Maher, 2000; Dold y cols., 2010). Además, las células de Kupffer activadas por la endotoxemia portal secundaria a colestasis, estimulan la liberación de quimioquinas por los hepatocitos, lo cual implica a su vez la infiltración por neutrófilos (Wakabayashi y cols., 2008)

En esencia, la inflamación crónica hepática y la fibrogénesis constituyen un agregado dinámico de linfocitos, macrófagos y células del estroma relacionadas por interacciones autocrinas y paracrinas (Holt y cols., 2008). En ratas con ligadura de colédoco a largo plazo persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez y cols. 2008). Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias inducen una respuesta hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico con una inhibición selectiva de los hepatocitos de la zona periportal (Donner y cols. 2007).

Ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, las células estrelladas y los miofibroblastos, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas hepáticas sintetizan un amplio espectro de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-1, RANTES), factor de activación plaquetario (*platelet activation factor*, PAF), IL-8 y moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1, VCAM), que son necesarias para el reclutamiento y la activación de los leucocitos en el intersticio (Bataller y Brenner, 2005; Rockey, 2006; Iredale, 2007; Gressner y cols. 2007; Friedman, 2008; Wasmuth y cols, 2010; Wasmuth y Weiskirchen, 2010). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas ya que éstas células expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Rockey, 2006; Gressner y cols. 2007; Aller et al 2010a; Day y cols. 2011). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune. Se considera que éstos dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Rockey, 2006).

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos) también sería secundaria a traslocación bacteriana intestinal. Endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones como consecuencia del aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan y cols. 2007). La traslocación bacteriana intestinal es una complicación de la hipertensión portal y, por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco

(Garcia-Tsao y Wiest, 2004; Sztrymf y cols. 2005; Karatepe y cols., 2010; Huang y cols., 2011). Las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana, que son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Garcia-Tsao y Wiest, 2004). Por lo tanto, la traslocación bacteriana es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf y cols. 2005; Abdeldayem y cols., 2007). El aumento de la producción de TNF- α puede inducir traslocación bacteriana en ratas con cirrosis y ascitis ya que el bloqueo de TNF- α es capaz de inhibirlo sin aumentar la incidencia de infecciones sistémicas (Sztrymf y cols., 2004; Francés y cols. 2007; Aller y cols. 2010b; Corradi y cols., 2011)

Las fases evolutivas tardías del modelo experimental de colestasis extrahepática se caracterizan por el desarrollo de angiogénesis, esto es, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de vasos pre-existentes (Kurz y cols. 2003; Davis y cols., 2011; Geudens y Gerhardt, 2011). Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas (fase vascular), el endotelio posee otras funciones antes de que los nuevos vasos se desarrollen (fase prevascular) (Aller y cols. 2007a, Aller y cols. 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar una función anti-inflamatoria. Dichas propiedades, anti-oxidantes y anti-inmunes, favorecerían la resolución, así como la progresión al fenotipo angiogénico vascular (Aller y cols. 2007b). La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al espacio intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller y cols. 2007b).

En ratas con ligadura de colédoco la proliferación de los conductillos biliares, como ocurre en la organogénesis hepática, precede a la proliferación de los microvasos que los vascularizan. Después de una semana de ligadura de colédoco, a pesar de la intensa proliferación biliar, el plexo arterial peribiliar mantiene su arquitectura normal. Por el contrario, después de 2 a 4 semanas de evolución se desarrolla una significativa

proliferación de la microvascularización que se extiende desde el plexo peribiliar de los tractos biliares (Gaudio y cols. 1996; Glaser y cols, 2009; Glaser y cols., 2011).

El papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis que ocurre después de la ligadura del colédoco en la rata ha sido corroborado al asociar la ligadura de la arteria hepática a la colestasis por ligadura del colédoco. En ésta situación, el hígado sufre un aumento de la apoptosis de colangiocitos, se altera la proliferación de los colangiolos con disminución de la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) por los colangiolos y desaparece el plexo peribiliar. Curiosamente, las funciones de los colangiocitos y, por lo tanto, la integridad del plexo peribiliar son preservadas mediante el tratamiento con VEGF-A recombinante (Gaudio y cols. 2006). Igualmente, en el trasplante de hígado en el ser humano la regeneración biliar se produce a expensas de una proliferación inicial del compartimento epitelial, seguido del compartimento vascular que parece ser inducido por la expresión epitelial de VEGF-A (Van den Heuvel y cols. 2006).

5. LAS CELULAS CEBADAS COMO MEDIADORAS DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS

En la producción de la fibrosis biliar secundaria a colestasis extrahepática por ligadura y sección del colédoco han sido implicados mediadores de los sistemas nervioso: norepinefrina; inmune: citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, y endocrino: el sistema renina-angiotensina. A su vez, la fibrosis hepática que se produce en roedores tras la ligadura y sección del colédoco es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kershenovich y Weissbrod 2003; Li y Crawford 2004; Allen y cols., 2011) cursando, por lo tanto, con las alteraciones propias de la inflamación: estrés oxidativo y nitrosativo y deterioro de la actividad antioxidante, edema de los tractos portales, activación de los macrófagos hepáticos y reclutamiento de células inflamatorias, en particular infiltración neutrofílica de los espacios periductulares hepáticos y de células cebadas en los espacios porta y en los septos portales en la vecindad de los

capilares del plexo arterial peribiliar (Rioux et al. 1996; Takechita y Shibayama 2005). En este sentido, la fibrosis biliar es similar al proceso de reparación tisular que ocurre en la curación de las heridas y que se caracteriza por acúmulo de proteínas de la matriz extracelular, en particular de colágeno (Aller y cols, 2008a)

Aunque todas las células hepáticas tienen un potencial fibrogénico, son las células estrelladas hepáticas las principales productoras de colágeno en el hígado. Sin embargo, en tanto que las células estrelladas hepáticas activadas son el principal tipo celular fibrogénico en las áreas pericentrales, los miofibroblastos portales pueden predominar cuando la lesión hepática tiene lugar alrededor de los tractos portales, como es el caso de la colestasis extrahepática, en la cual se produce una intensa respuesta fibrótica en los tractos portales (Lazaridis et al. 2004; Mormone y cols, 2011; Lee y Friedman 2011). De hecho, se ha demostrado que los fibroblastos portales son capaces de transdiferenciarse en miofibroblastos en modelos experimentales de fibrosis en roedores, tras ligadura del colédoco, y en la cirrosis biliar humana (Kinnman y Housset, 2002; Kraglov et al. 2006; Omenetti y cols., 2008, Omenetti y cols., 2011).

Las células cebadas o mastocitos están ampliamente distribuidas por prácticamente todos los tejidos vascularizados del organismo, donde se localizan en estrecha proximidad con los vasos sanguíneos y los nervios (Galli y cols. 2005). Son especialmente abundantes en los lugares anatómicos que están directamente expuestos al medio ambiente, como son el tracto gastrointestinal, la piel y las vías aéreas (Galli y cols. 2005; Metz y cols. 2007). Se ha demostrado que las células cebadas están presentes en el hígado, tanto en condiciones normales como patológicas en el ser humano y en la rata (Farrel y cols. 1995; Rioux y cols. 1996). Múltiples estudios han comprobado que los mastocitos están implicados en diversas hepatopatías (Farrel y cols. 1995; Armbrust y cols. 1997; Yamashiro y cols. 1998; Matsunaga y Terada, 2000), demostrándose así que éstas células inmunes tienen un papel más amplio de lo que se pensaba originalmente (Franceschini y cols. 2006).

Las células cebadas contienen histamina, heparina, serinproteasas, como quimasa y triptasa, y citoquinas multifuncionales (Theoharides y cols.,

2012), que son importantes mediadoras de los procesos de cicatrización y curación de las heridas (Artuc et al. 1999). Por lo tanto, las células cebadas desempeñan un papel clave en la remodelación tisular y la fibrosis. Diversos mediadores sintetizados por estas células, como triptasa, TGF- β y TNF- α , pueden inducir la proliferación de fibroblastos y de células estrelladas hepáticas y la síntesis de colágeno por distintos tipos celulares (Gordon y Galli 1994; Gara et al. 2002; Vliagoftis y Befus 2005). Las células cebadas producen además metaloproteasas de la matriz (MMP-1, MMP-2 y MMP-9), así como inhibidores tisulares de MMPs (TIMP-1) (Atamas y White 2003), lo cual indica que están también implicadas en la degradación de la matriz extracelular, contribuyendo por tanto a un desequilibrio entre su síntesis y su degradación (Armbrust et al. 1997).

Las células cebadas activadas producen gran cantidad de factores fibrogénicos y quimiotácticos que inducen la proliferación de los fibroblastos y la síntesis de colágeno (Welle 1997; Valent et al. 1998). Las células cebadas, por tanto, contribuyen a la fibrosis, remodelación y reparación tisular y se acumulan en la enfermedad inflamatoria intestinal en el ser humano, incluyendo la colitis ulcerosa, el síndrome de intestino irritable y la enfermedad de Crohn (He 2004), así como en la enteropatía hipertensiva portal en la rata (Díez-Arias et al. 1991; Prieto et al. 2005). Además, las células cebadas están implicadas en el desarrollo de fibrosis en patologías del cartílago articular, la piel, el pulmón, el riñón y el hígado (Armbrust et al. 1997; Kondo et al. 2001).

En el hígado se acumulan células cebadas en múltiples enfermedades (Fallerel et al. 1995), como son la hepatopatía alcohólica, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la atresia biliar, la hepatolitiasis, el rechazo crónico del injerto hepático y en la colestasis biliar. Al igual que en otros órganos y tejidos, en el hígado las células cebadas deben estar implicadas en la respuesta inmune local y en el mantenimiento y la reparación del tejido conectivo (Pepys y Edwards 1979).

En el hígado, las células cebadas secretan varios mediadores que promueven el crecimiento y la proliferación de los fibroblastos y que estimulan la producción de proteínas de la matriz extracelular por los fibroblastos y las células estrelladas (Takeshita y Shibayama 2005). De

hecho, existe una correlación positiva entre el grado de acumulación de células cebadas y la extensión del depósito de matriz en pacientes con hepatopatías crónicas (Fallerel et al. 1995). Incluso en la actualidad se considera que la proliferación ductular biliar, unido a la fibrosis y a la infiltración hepática por células cebadas son los cambios característicos de la hepatopatía colestásica (Takeshita y Shibayama 2005).

Se ha comprobado que la degranulación de las células cebadas está implicada en la disrupción de los complejos motores celulares secundaria a la acción de la colecistoquinina, por lo tanto, las células cebadas están activamente implicadas en el control fisiológico y patológico de la motilidad intestinal (Saavedra 2003), así como en la permeabilidad de la mucosa intestinal, en la adherencia bacteriana a la mucosa y en el inicio de la inflamación intestinal.

En el hígado colestásico se produce la infiltración por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos, células cebadas), en parte como consecuencia de traslocación bacteriana intestinal (Assima y cols. 2006). Sin embargo, el origen de la respuesta inflamatoria podría estar localizada en los propios colangiocitos, que sufren tanto la hiperpresión biliar y el efecto tóxico de los ácidos biliares, como la posible isquemia secundaria a la compresión del plexo arterial peribiliar (Nakamura y cols. 1997; Gaudio y cols. 2006; Allen y cols., 2011). En éste sentido, la respuesta inflamatoria inicial en los colangiocitos estimularía su proliferación, activaría las células hepáticas que poseen capacidad proinflamatoria (células de Kupffer y macrófagos), induciría la angiogénesis secundaria a la isquemia arterial, favorecería la infiltración portal por leucocitos y, finalmente promovería la fibrogénesis.

Las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis hepática, tanto en roedores como en el ser humano (Armbrust y cols. 1997; Matsunaga y cols. 1999). La ligadura del colédoco en la rata, un modelo de fibrosis hepática (Kountouras y cols. 1984), cursa con un aumento de las células cebadas en el hígado (Mori y cols. 1966; Rioux y cols. 1996). Sin embargo, todavía se desconoce el mecanismo por el cual las células cebadas participan en el desarrollo de fibrosis. Ya que la ligadura del colédoco en la rata produce una inflamación hepática (Ramadori y Suile,

2004a) y muchos mediadores liberados por las células cebadas son pro-inflamatorios (Galli y cols. 2005; Metz y cols. 2007; Theoharides y cols., 2012), se podría especular que la activación de las células cebadas influiría en la fibrosis hepática en el contexto de una respuesta inflamatoria crónica. En este sentido, la fibrosis asociada a la remodelación tisular, ambas mediadas por los mastocitos, podrían ser una de las principales consecuencias de la inflamación hepática crónica (Bachelet y cols. 2006; Metz y cols. 2007). Por ello, se ha sugerido que la fibrogénesis hepática se asemeja a un proceso de cicatrización (Ramadori y Saile, 2004a; Ramadori y Saile, 2004b; Aller y cols, 2008a)

Las interacciones entre las células cebadas y los fibroblastos son fundamentales en la génesis de la fibrosis (Gruber, 2003; Albrecht y cols. 2005). Las células cebadas pueden comunicarse con los fibroblastos, lo cual induce su activación y la subsiguiente modulación de algunos aspectos de la fibrosis (Albrecht y cols. 2005; Au y cols. 2007). Sin embargo, los resultados de un estudio que utilizaba ratas *Ws/Ws*, deficientes en células cebadas, sugirió que un aumento de células cebadas en el hígado podría estar asociado con fibrosis, pero que no era la causa (Sugihara y cols. 1999). Además, las células cebadas deben participar en la fibrinólisis produciendo MMP-1 en los estadios tardíos, tanto de la fibrosis como de la cirrosis experimental (Jeong y cols. 2002). Ya que las terapias efectivas de la cirrosis hepática deben estar basadas en la comprensión de su patogenia (Friedman, 2007), un mejor conocimiento de ésta acción dual, pro- y anti-fibrogénica de las células cebadas en la fibrosis biliar experimental sería de gran interés.

Las células cebadas en el hígado fibrótico pueden además estar implicadas en la arterialización hepática ya que la estructura de los sinusoides cambia y es similar a la de los capilares (Zimmermann y cols. 1999). Este cambio se denomina "capilarización sinusoidal" y las células cebadas pueden ser elementos clave en éste proceso de transformación de las células endoteliales sinusoidales en células endoteliales de tipo capilar (Zimmermann y cols. 1999; Franceschini y cols. 2006). La capilarización altera el intercambio fisiológico entre el plasma y los hepatocitos y es la

causa principal del empeoramiento de la función hepática (Zimmermann y cols. 1999).

La hiperplasia de las células cebadas se asocia con la proliferación biliar durante la colestasis extrahepática (Takeshita y Shibayama, 2005; Franceschini y cols. 2006). Este hallazgo sugiere que la acumulación de células cebadas en las tríadas portales puede estar implicada en la proliferación biliar. La recanalización del colédoco previamente ligado comporta un incremento brusco y transitorio del número de células cebadas, que se asocia con un rápido aumento del número de células epiteliales biliares apoptóticas. Así, las células cebadas intersticiales hepáticas pueden estar implicadas en la remodelación hepática mediante la inducción de apoptosis (Takeshita y Shibayama, 2005).

Por lo tanto, se podría especular que el papel de las células cebadas en la colestasis extrahepática experimental es doble, es decir, que cambia a lo largo de la evolución del hígado colestásico. En fases evolutivas precoces las células cebadas participarían en el proceso proinflamatorio que induce la proliferación biliar y la fibrogénesis (Rioux y cols. 1996). Sin embargo, la colestasis prolongada al modificar el medio ambiente induciría un cambio en el fenotipo de los mastocitos, promoviendo la fibrolisis al inducir metaloproteasas y, subsiguientemente la degradación de la matriz (Jeong y cols. 2002). Este supuesto papel protector y antifibrótico de las células cebadas en la colestasis crónica explicaría el incremento persistente de su número durante la producción de fibrosis y/o cirrosis hepática, que se asocia con un marcado descenso de miofibroblastos y de macrófagos en las regiones periportales (Jeong y cols. 2002). Las células cebadas, debido a su localización periportal, inducirían la apoptosis del epitelio biliar reduciendo la apoptosis hepatocitaria y éste puede ser otro mecanismo por el cual las células cebadas inducen una actividad antifibrogénica, así como la preservación de los hepatocitos (Canbay y cols. 2004; Ghavami y cols. 2005).

Al corregir el imbalance epitelial producido por la colestasis entre los dos tipos de células epiteliales hepáticas, biliar (proliferación) y hepatocitario (apoptosis), los mastocitos intentarían limitar la fibrosis característica de la inflamación hepática crónica. Estas acciones protectoras

pueden ser asumidas en algunas circunstancias por las células cebadas que protagonizarían entonces el control de la inflamación (Kinet, 2007). La hiperexpresión de citoquinas proinflamatorias por los colangiocitos colestásicos también podría regular tanto las alteraciones en la secreción biliar (Geier y cols. 2003) como la supervivencia de los propios colangiocitos (Wolf y Vierling 1993).

La ligadura del colédoco en la rata causa la proliferación biliar con elongación del árbol biliar, así como su ramificación (Nakanuma y cols. 1997; Masyuk y cols. 2001). A su vez, la proliferación biliar induce la proliferación vascular o angiogénesis. La vía biliar se rodea de un plexo vascular arterial que procede de las ramas de la arteria hepática (Nakamura y cols. 1997). Durante el desarrollo embrionario las células epiteliales biliares migran a través del mesénquima y se transforman en túbulos durante el estadio de formación de la vía biliar intrahepática (Roberts y cols. 1997). A su vez, el plexo vascular arterial peribiliar se desarrolla y madura en relación con el tracto biliar. Sin embargo, en tanto la vía biliar madura, el plexo vascular periarterial permanece inmaduro y continúa proliferando hasta que alcanza su madurez a lo largo de la vida postnatal (Nakamura y cols. 1997). En la colestasis extrahepática la proliferación biliar también parece preceder a la proliferación vascular (Gaudio y cols., 2006). Tras la ligadura del colédoco en la rata la proliferación de colangiocitos es un proceso rápido que consigue ocupar el 30% del total de las células hepáticas, en tanto que en el hígado normal los colangiocitos representan el 2% de la masa celular hepática (Alvaro y cols., 2006). La proliferación de colangiocitos es modificada por neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas. En particular, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) protagoniza la hiperplasia ductular. VEGF-A y VEGF-C aumentan en los conductos biliares de ratas con ligadura del colédoco ya que pueden ser secretados por los colangiocitos (Gaudio y cols., 2006). Puesto que VEGF también regula la angiogénesis, parece lógico suponer que los colangiocitos proliferantes controlan, mediante la liberación de VEGF, la formación de un plexo vascular que suministre sangre para cubrir las demandas funcionales del epitelio biliar intrahepático proliferante (Gaudio y cols., 2006)

La inflamación de origen biliar también puede inducir la apoptosis de los hepatocitos. La hiperproducción de citoquinas (TNF- α) se ha asociado a la apoptosis hepatocitaria (Ding y Yin, 2004). En los síndromes colestásicos destaca la activación del factor de transcripción NF- κ B ya que las elevadas concentraciones de ácidos biliares en los hepatocitos activan NF- κ B (Miyoshi y cols. 2001; Zollner y cols., 2005). La activación de NF- κ B, a su vez, promueve la expresión de ligandos asociados a muerte celular por las células de Kupffer, como Fas y TNF, que son citotóxicos para el hígado (Nanji y cols, 1999; Ding y cols, 2004; Malhi y cols, 2006).

Las células progenitoras de células hepáticas ó células madre también podrían desempeñar un importante mecanismo en la proliferación biliar. En lesiones hepáticas por D-galactosamina la regeneración del hígado ocurre a expensas de células epiteliales biliares, denominadas células ovas, que derivan probablemente de los canales de Hering. Ya que las células biliares que proliferan expresan α -1-fetoproteína, esta reactivación de genes fetales ha planteado la existencia de un proceso de retrodiferenciación en la colestasis (Kuhlmann 2006).

En la colestasis extrahepática la alteración hepática predominante es la marcada proliferación ductular con una infiltración inflamatoria portal moderada y apoptosis hepatocitaria (Sánchez-Patán y cols, 2008a), constituyendo un modelo experimental de fibrosis biliar a largo plazo (Aube y cols. 2007; Sánchez-Patán y cols., 2008a).

La fibrosis hepática post-ligadura del colédoco en roedores es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kerhenobich y Weissbrod, 2003; Li y Crawford, 2004). La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular entre las que se incluye el colágeno (Bataller y Brenner, 2005; Rockey 2006; Gressner y cols. 2007). Un concepto fundamental respecto de la etiopatogenia de la fibrosis hepática es que éste proceso representa una respuesta de cicatrización por parte del organismo frente a otra agresión que es similar a la respuesta de otros órganos a una agresión recurrente (Rockey, 2006; Aller y cols, 2008; Aller y cols, 2010c)

El estrés oxidativo y enzimático y la infiltración por células inflamatorias en la colestasis obstructiva experimental podrían estar

implicados en la patogenia de la proliferación de células epiteliales biliares y en la reduplicación y ramificación de los conductos y conductillos biliares (Kilicoglu y cols., 2008). Así, se ha sugerido que el efecto hepatoprotector de la miel en ratas con ligadura del colédoco podría ser secundario a sus actividades antioxidante y anti-inflamatoria (Kilicoglu y cols., 2008).

Una intensa proliferación biliar en los espacios porta caracteriza a la colestasis extrahepática microquirúrgica a largo plazo en la rata. Los conductos biliares proliferantes invaden las zonas 1 y 2 del acino de Rapaport, pero no la zona 3 o pericentral (Aller y cols., 2004) y ésta es la razón de que sea considerada una proliferación "atípica" (Alvaro y cols., 2007).

En esencia, la respuesta fisiopatológica del hígado cuando se alteran tanto el flujo biliar (colestasis extrahepática) como portal (capilarización sinusoidal e hipertensión portal) es la atrofia del área hepática afectada y la hipertrofia del área no afectada (Black y Behrus, 2002). Histopatológicamente, el complejo atrofia-hipertrofia se caracteriza por fibrosis septal en el hígado atrófico con necrosis biliar en mosaico, apoptosis y proliferación ductular (Black y Behrus, 2002; Kilicoglu y cols. 2008).

Los colangiocitos son un epitelio biológicamente importante por los múltiples procesos celulares en los que participan, incluyendo el transporte de agua, iones y solutos (Boger y Larusso, 2007). Estas células epiteliales biliares han sido propuestas como la "diana" principal de los ácidos biliares en el hígado. Los ácidos biliares alteran significativamente la secreción, la proliferación y la supervivencia de los colangiocitos (Xia y cols., 2006). Así, los ácidos biliares pueden antagonizar la pérdida de conductillos biliares inducida por la denervación colinérgica en la rata con ligadura de colédoco (Marzioni y cols., 2006). Sin embargo, durante su intensa proliferación en colestasis obstructiva, los colangiocitos adquieren un fenotipo neuroendocrino y secretan múltiples sustancias, entre las que se incluyen neurotransmisores (serotonina) (Marzioni y cols., 2005), neuropéptidos (péptidos opioides, como met-enkefalina) (Muezi y cols. 2006; Mombeini y cols. 2006; Nelson y cols. 2006; Marzioni y cols. 2007), hormonas (prolactina) (Bogorad y cols. 2006) y sus receptores (estrógenos) (Alvaro y cols. 2007) y factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento similar

a Insulina (*Insuline-like growth factor*, IGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*; PDGF), el factor de crecimiento hepatocitario (*hepatocyte growth factor*, HGF), TGF- β y VEGF (Marzioni y cols. 2006; Alvaro y cols. 2007). La activación de células progenitoras hepáticas en el hígado colestásico es regulada por factores neuronales y neuroendocrinos que modulan la biología de los colangiocitos malignos y no-malignos (Marzioni y cols. 2006).

La activación de las células estrelladas hepáticas es un factor patogénico clave en la producción de fibrosis hepática ya que los miofibroblastos resultantes son principalmente responsables del ensamblaje del tejido conectivo (Rockey, 2006; Gressner y cols. 2007; Proell y cols. 2007). Múltiples y variados estímulos contribuyen a la inducción y el mantenimiento de la activación de las células estrelladas hepáticas, como son el estrés oxidativo, los neurotransmisores (norepinefrina), la Cascada Renina-Angiotensina, citoquinas (IL-4, IL-13), quimioquinas y factores de crecimiento, p.ej. el factor de crecimiento transformador β_1 (*transforming growth factor* β_1 ; TGF β_1) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (*connective tissue growth factor*; CTGF) (Sedlacek y cols. 2001; Rockey, 2006; Muddu y cols. 2007; Gressner y cols. 2007; Proell y cols. 2007; Friedman, 2008; Sánchez-Patán y cols, 2008a). En particular, los radicales libres de oxígeno son capaces de activar NF- κ B y así, la producción de citoquinas proinflamatorias (Aller y cols. 2004). Se establecería por tanto una relación entre estrés oxidativo, inflamación y fibrogénesis (Ramadori y Smile, 2006b). Además, las células epiteliales que proliferan también son una importante fuente de CTGF en la rata con fibrosis biliar (Sedlacek y cols. 2001).

En la colestasis los ácidos biliares inducen apoptosis de los hepatocitos y se ha propuesto que dicha apoptosis facilita a su vez la activación de las células estrelladas hepáticas (Canbay y cols. 2002). Por lo tanto, en la colestasis extrahepática los ácidos biliares están implicados tanto en la proliferación biliar como en la fibrogénesis (Isayama y cols. 2006). Además, la endotoxemia presente en colestasis (Ingoldby y cols. 1984) también podría exacerbar la fibrogénesis hepática. En ratones con

colestasis extrahepática, la administración de LPS favorece la fibrogénesis hepática. Esta acción fibrogénica de LPS está mediada por CD₁₄ y TLR-4 (*Toll-like receptor-4*) y es estimulada por la proteína de unión a lipopolisacárido (*lipid binding protein*; LBP) (Isayama y cols. 2006). Ratones con ligadura del colédoco y déficit de CD4 no expresan TNF- α , IFN- γ , factor inductor de macrófagos (*macrophage induction factor*, MIF), ni TGF β , una citoquina con potente acción fibrogénica (Yang y cols. 2003; Isayama y cols. 2006). Aunque la retención de ácidos biliares por sí sola es suficiente para producir lesión hepatocelular, proliferación biliar, respuesta inflamatoria moderada y discreta fibrosis, cuando se asocia a estímulo por LPS, mediado por el receptor CD₁₄, se activan macrófagos y aumenta la síntesis de agentes oxidantes y de citoquinas y, en consecuencia, la fibrosis (Isayama y cols. 2006).

Las células estrelladas hepáticas, al ser estimuladas por PDGF, por factor de crecimiento epitelial (*epithelial growth factor*; EGF) y TGF β ₁ expresan MMP-2, que induce su migración. La migración de las células estrelladas hepáticas es dependiente de Integrinas ya que la administración de anticuerpos anti-integrinas α_1 y α_2 inhiben dicha migración (Yang y cols. 2003). Otros mediadores que activan a las células estrelladas hepáticas son neurotransmisores, como noradrenalina, que aumentan la expresión hepática de TGF- β ₁ (Oben y cols. 2004), leptina (Ikejima y cols. 2003) y angiotensina II, que no solo aumenta la fibrosis hepática, sino que promueve el estrés oxidativo, la inflamación y la trombogénesis (Bataller y cols. 2005). Así, las células estrelladas hepáticas son posteriormente estimuladas de forma paracrina por trombocitos, leucocitos polimorfonucleares, células cebadas y linfocitos que infiltran el hígado, pero también por células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales y hepatocitos para diferenciarse en miofibroblastos (Szabo y cols. 2007; Gressner y cols. 2007; Sánchez-Patán y cols., 2008a). Las células estrelladas hepáticas podrían también tener su origen en la médula ósea y adquirir el fenotipo miofibroblasto si está presente el medioambiente hepático estresor adecuado (Gressner y cols. 2007; Friedman, 2008).

El miofibroblasto hepático es la principal célula responsable de la promoción del depósito de colágeno fibrilar en el hígado colestásico (Bataller y Brenner, 2005; Gressner y cols. 2007). La gran plasticidad de los miofibroblastos hepáticos sugiere que incluso podrían coexistir diversos inmunofenotipos en la fibrosis biliar crónica, p.ej. portal, septal, intermedios o de transición y perisinusoidales (Cassiman y cols. 2002). La coexistencia de transición epitelio-mesenquimal del epitelio biliar o de los hepatocitos ha sido también propuesta en ésta patología (Sicklick y cols., 2006; Henderson e Iredale, 2007; Friedman, 2008). La coexpresión de marcadores de células epiteliales y mesenquimales por algunas células del hígado adulto sugiere que la existencia de transición epitelio-mesenquimal puede producirse también durante la vida post-natal. En los hígados fetales la transición epitelio-mesenquimal constituye un mecanismo implicado en el desarrollo hepático (Ghagraoui y cols. 2003). Asimismo, algunos hepatocitos adultos podrían ser capaces de sufrir una transición epitelio-mesenquimal ya que progenitores epiteliales hepáticos, esto es, las células ovals, expresan conjuntamente marcadores epiteliales y mesenquimales, en tanto que las células estrelladas hepáticas pueden ser inducidas para que expresen genes que las confieren un fenotipo epitelial (Sicklick y cols. 2006). Se explicaría así que conductillos biliares proliferantes en niños con atresia biliar expresen el marcador mesenquimal α -SMA. Por lo tanto, la transición desde el fenotipo epitelial al fenotipo mesenquimal en la colestasis extrahepática constituiría un nuevo mecanismo productor de fibrosis (Zavadil y cols. 2005; Sicklick y cols. 2006).

Dada la plasticidad de las células estrelladas hepáticas y de las células del parénquima hepático (eje hepatocito-colangiocito), puede hipotetizarse que durante la evolución del hígado colestásico éstas células pueden expresar los mismos fenotipos que se suceden en la respuesta inflamatoria post-traumática (Aller y cols. 2004; Aller y cols. 2006): un fenotipo de isquemia-reperfusión (hipóxico), un fenotipo leucocitario (con respuesta pro y anti-inflamatoria) y, por último, un fenotipo angiogénico con proliferación biliar y fibrosis.

Durante estas fases evolutivas los colangiocitos podrían adoptar un comportamiento similar a las células tumorales con una complejidad

metabólica progresiva (neuroendocrina), que se asocia a una complejidad estructural creciente. En éste supuesto, el tipo de tumor que se desarrolla sería benigno, a pesar de su importante capacidad para invadir el parénquima. Este tumor biliar atípico parece capaz de inducir una respuesta inflamatoria en el hígado remanente o "hígado hepatocitario del huésped". Además, es posible que éste hígado compuesto por hepatocitos del huésped pueda participar en el desarrollo del tumor biliar por un proceso denominado desmoplasia. Esto consiste en células fibroblásticas y matriz extracelular, elementos inflamatorios de respuesta inmune, representados por linfocitos, macrófagos y células dendríticas, con angiogénesis, evidenciada por los vasos sanguíneos neoformados (Marcel y Lamy, 2003). En esencia, todos los elementos que constituyen la respuesta inflamatoria participan en ésta "reacción del hígado del huésped", que puede tener un objetivo trófico para el desarrollo del tumor colestásico biliar. La persistencia de ésta respuesta inflamatoria durante una evolución más prolongada induciría un grado más intenso de dediferenciación tumoral (Arias y cols. 2005; Arias y cols. 2006; Arias y cols. 2007), produciendo una transformación celular maligna como ocurre en el ser humano cuando se produce un cáncer de la vía biliar o colangiocarcinoma (Marzioni y cols. 2006; Yang y cols., 2011)

6. KETOTIFÉN: UN FÁRMACO ESTABILIZADOR DE LAS CÉLULAS CEBADAS

El fumarato de ketotifén se designa químicamente como 4-(1-metilpiperidin-4-ylideno)-4,9 dihidro-10*H*-benzo [4,5] ciclohepta [1,2-*b*] tiofén-10-1 hidrogeno (*E*)-butanodieno, su fórmula es $C_{19}H_{19}NOS.C_4H_4O_4$ y su masa molecular $425.5g.mol^{-1}$ (Mihun y cols., 1984; British Pharmacopoeia 2009; Frag y cols., 2011). Ketotifén es un potente y selectivo antagonista H_1 no competitivo (Martin y Roemer, 1997; Abounassif y cols., 2005) que actúa directamente sobre la membrana celular de las células cebadas estabilizando su estructura al evitar la fusión implicada en la exocitosis y, por lo tanto, previene la liberación de mediadores inmunológicos (Gilles et al, 2003; Greiner y cols., 2003).

Ketotifén es bien absorbido tras su administración oral, alcanzando sus concentraciones plasmáticas un pico a las 2-4 horas (Grant et al, 1990). La biotransformación de ketotifén es realizada por los microsomas hepáticos utilizando cuatro rutas metabólicas en el ser humano: demetilación, N-oxidación, N-glucuronidación y cetorreducción (Le Bigot y cols., 1983; Breyer-Pfaff y cols., 2010). El aclaramiento plasmático del fármaco es bifásico, con una vida media de eliminación de 22 horas en el ser humano adulto (Grant et al, 1990). Sin embargo, existen diferencias de especie respecto del metabolismo de ketotifén y en la rata es metabolizado por los hepatocitos más rápidamente que en el ser humano (50 nmoles/h/10⁶ cél. vs 12 nmoles/h/10⁶ cél.) (Le Bigot et al, 1986).

Este fármaco produce mínimos efectos colaterales y su administración común por vía oral ha facilitado su uso en la clínica humana desde hace muchos años (Bassler y cols, 2004; Repchinsky y cols., 2006). Además, ketotifén puede ser administrado con seguridad por vía sistémica y numerosos estudios han permitido mejorar la permeabilidad cutánea de éste fármaco haciendo posible su aplicación tópica en asma y procesos alérgicos (Chiang y cols., 1998; Bhattacharya y Ghosal; 2001; Inoue y cols., 2005). Estos estudios permitirán en el futuro la aplicación local de ketotifén en el ser humano, administrándolo directamente en la zona cutánea lesionada para reducir la cicatrización excesiva, las contracturas patológicas y, en definitiva mejorar la calidad de vida de los pacientes. En particular, los hallazgos obtenidos al estudiar modelos experimentales en el cerdo permiten garantizar la realización en el futuro de estudios clínicos con ketotifén en los pacientes quemados.

Para facilitar su administración por vía intraperitoneal y evitar su rápida biodegradación, ketotifén ha sido encapsulado en microesferas de Poli (D, L-lactido) y de Poli (D, L,-lactido-co-glicólido). Después de su administración intraperitoneal las microesferas se detectan en el tejido adiposo y se comprueba la liberación eficaz de ketotifén (Guerrero y cols.; 2008). El diseño de microesferas con ketotifén ha permitido utilizar con éxito ésta vía de administración en la profilaxis y el tratamiento de la

respuesta inflamatoria secundaria a la hipertensión portal en la rata (Sánchez-Patán y cols., 2008a; Sánchez-Patán y cols., 2008b).

Ketotifén posee una actividad citoprotectora gastrointestinal y es antiinflamatorio (Schoch, 2003; Penissi y cols. 2003) y es un fármaco profiláctico muy útil en el asma bronquial, la rinitis alérgica y otras enfermedades alérgicas. En éste sentido, ketotifén ha demostrado su efectividad en la inflamación de las vías aéreas al inhibir la síntesis y liberación de quimioquinas Th1 y Th2 por monocitos tras su estimulación por LPS. Así, disminuyen la quimioquina derivada de macrófagos (*Macrophage-derived chemokine; MDC*), una quimioquina de tipo Th2 implicada en el reclutamiento de células Th2 hacia las áreas de inflamación expuestas al alérgeno, pero también las quimioquinas Th1 monoquina inducida por interferón- γ (*monokine induced by interferon-gamma; MIG/CXCL9*) y proteína-10 inducible por interferón (*interferon-inducible proteína 10; IP-10/CXCL10*). Este efecto supresor de ketotifén sobre la liberación de MDC e IP-10 está mediado, al menos en parte, por la inhibición de la expresión de de p38- y ERK-*mitogen-activated proteína kinase* (MAPK) (Hung y cols., 2007). Ketotifén ha demostrado además su capacidad para eliminar la ascitis y las adenopatías abdominales en pacientes con Síndrome Hipereosinofílico Idiopático, una patología sistémica caracterizada por la infiltración eosinofílica que suele afectar al tracto gastrointestinal (Tang y cols., 1997; Casella y cols., 2011).

Además ha demostrado su acción terapéutica en el colon irritable, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Jones, 1998; Klooker y cols., 2010; O'Sullivan, 2011; Ford y Talley, 2011), así como en diferentes modelos experimentales de colitis, reperusión intestinal y de íleo postoperatorio (De Jonge et al, 2004; Serra y Vergara, 2006; The y cols. 2009). La administración de ketotifén a ratas expuestas a la acción crónica de ovoalbúmina reduce significativamente la infiltración intestinal por células cebadas y el contenido de RMCP-II, bloqueando la hipermotilidad intestinal asociada a éste modelo de inflamación alérgica intestinal. Estos resultados avalan la relevancia de las células cebadas en la actividad motora del tracto gastrointestinal (Traver y cols., 2010). Además, ketotifén

también ejerce una acción beneficiosa en la diarrea producida por el cólera, que implica la liberación de mediadores pro-inflamatorios, como citoquinas, prostaglandinas y óxido nítrico. Así se evidencia el importante papel que también tienen las células cebadas en la secreción intestinal (Rocha y cols., 2003).

Ketotifén tiene la capacidad de reducir significativamente las alteraciones de la microcirculación que se producen en la mucosa intestinal como consecuencia de la inflamación producida por la administración de fármacos como la indometacina, lo cual indica los efectos de la degranulación de las células cebadas en la patología inflamatoria intestinal (Ruh y cols, 2000).

La degranulación de las células cebadas pancreáticas tienen un importante papel en la activación de la respuesta inflamatoria local y sistémica en las fases iniciales y en la progresión de la pancreatitis aguda (López-Font y cols., 2010). Por ello, la administración de fármacos estabilizadores de mastocitos, como ketotifén, en ratas con pancreatitis aguda disminuye el acúmulo de células cebadas en el páncreas, reduce el edema, la infiltración por neutrófilos, los niveles séricos de amilasa y la actividad de mieloperoxidasa. La acción protectora de ketotifén en esta patología se atribuye al bloqueo de la degranulación de las células cebadas y, por tanto de la liberación de mediadores proinflamatorios, y a la estimulación de la síntesis de NO (Yönetçi y cols., 2001; Lopez-Font y cols., 2010).

Curiosamente, ketotifén también ejerce efectos metabólicos beneficiosos, lo cual ha permitido plantear la estabilización de las células cebadas como una nueva opción terapéutica en la obesidad y la diabetes (Wang y Shi, 2011). El tejido adiposo blanco de los pacientes obesos contiene un gran número de células cebadas y los niveles séricos de triptasa en estos pacientes son también más elevados que en sujetos normales. Por eso, la estabilización de las células cebadas con ketotifén aumenta el gasto energético, mejora la sensibilidad periférica a la insulina y reduce la ganancia de peso corporal (Wang y Shi, 2011). Igual que los

macrófagos y los linfocitos T, los mastocitos son células inflamatorias que participan en la etiopatogenia de múltiples enfermedades inflamatorias, como las alteraciones cardiovasculares y los trastornos metabólicos. De hecho, en modelos experimentales se ha comprobado recientemente la participación de las células cebadas en la obesidad y la diabetes tipo 2 (Wang, y Shi, 2011). Aunque los mecanismos por los que las células cebadas participan en la patobiología de estas enfermedades metabólicas aún no se conocen completamente, la administración de fármacos estabilizadores de estas células constituyen una esperanza para estos enfermos que padecen estas patologías inflamatorias crónicas de gran prevalencia en la actualidad (Zhang y Shi, 2012; Xu y Shi, 2012).

La estabilización de las células cebadas con diversos fármacos, entre ellos ketotifén mejora la supervivencia en los pacientes con sepsis al inhibir la liberación extracelular de *high mobility group box 1* HMGB1 a la circulación sistémica por las células apoptóticas (Ramos y cols., 2010). En un modelo de peritonitis séptica por punción y ligadura del ciego se ha demostrado que la degranulación sistémica de las células cebadas aumenta la mortalidad (Seeley y cols., 2011) Estos hallazgos confirman la participación de las células cebadas regulando la muerte celular en la sepsis y representa una alternativa terapéutica para la patología infecciosa en la clínica humana que podrá ser utilizada en un futuro próximo (Ramos y cols., 2010).

Por último, ketotifén ha demostrado su efectividad en diversas patologías fibróticas, como son la estenosis esofágica secundaria a quemaduras por álcalis (Yukselen et al, 2004), en el edema sólido persistente del acné (Jungfer et al, 1993), en la fibrosis cutánea (Walter et al, 1990; Gallant-Behn et al, 2008) o la urticaria (Egan et al, 1997), en las patologías fibróticas de la cicatrización (Kischer y Bailey 1972; Garbuzenko y cols. 2002; Gallant-Behm y cols., 2008), en la esclerodermia (Claman, 1990; Ng, 1992), en la mastocitosis sistémica (Povoa et al, 1991), en las contracturas articulares post-traumáticas (Monument y cols., 2010; Monument y cols., 2011), en el tratamiento de la infertilidad masculina

(Oliva et al, 2006) y en el tratamiento del asma (Schwarzer et al, 2004) o de los procesos inflamatorios de la conjuntiva (Kidd et al, 2003; Woerly et al, 2003). La hiperplasia de células cebadas es un hallazgo muy común en el tejido fibroso y en patologías fibróticas, tanto sistémicas, como la artritis reumatoide, la fibrosis pulmonar y la fibrosis hepática, como cutáneas (queloides, cicatrices hipertróficas, fibroproliferativas y retráctiles (Lee y Vijayasingam; 1995; Harunariy cols., 2005).

Las células cebadas sintetizan gran cantidad de mediadores profibróticos, como proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, muchas de las cuales ejercen efectos mitogénicos sobre los fibroblastos y los miofibroblastos. Además, las células cebadas estimulan la proliferación y la contractilidad de los fibroblastos, así como la síntesis de colágeno, la contracción de las heridas y la remodelación tisular (Kischer y Bailey 1972; Skold y cols. 2001; Garbuzenko y cols. 2002; Moyer y cols. 2004; Iba y cols. 2004). En particular, las células cebadas se localizan en íntima relación con los fibroblastos, miofibroblasto y con neuronas sensitivas en la piel, lo cual permite sugerir la implicación de estas células en neuroinflamación (Alving y cols, 1991; Hart y cols., 2005)

La estabilización de las células cebadas con ketotifén parece afectar al hipotético “eje neural-célula cebada-miofibroblasto” y, subsiguientemente a la expresión del fenotipo hipercontractil, al modular la composición del medioambiente durante la cicatrización cutánea y articular (Hildebrand y cols 2007; Gallant-Behn et al, 2008). Estas evidencias experimentales han permitido proponer la implicación de éste eje en procesos patológicos en múltiples tejidos asociados con excesiva contracción y depósito de matriz extracelular, así como sugerir la administración de ketotifén como profilaxis y tratamiento para reducir la contracción excesiva de la cicatriz, así como la fibrosis en la clínica humana (Gallant-Behn et al, 2008).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El desarrollo de cirrosis hepática en múltiples hepatopatías crónicas de etiología diversa es un proceso multifuncional mediado por células inflamatorias que, al liberar mediadores profibrogénicos, activan a las células estrelladas y a los miofibroblastos. En particular, la cirrosis secundaria a la obstrucción de la vía biliar causa alteraciones intrahepáticas que pueden ser atribuidas a la evolución de una respuesta inflamatoria. Las principales alteraciones son edema portal, infiltración leucocitaria, proliferación del epitelio biliar y fibrosis. La grave afectación que produce la colestasis, tanto a nivel esplácnico como sistémico, comporta todavía una elevada morbi-mortalidad en la clínica humana y éste ha sido el motivo de la creación de nuevos modelos experimentales para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en su producción, así como el desarrollo de una más eficaz profilaxis y terapia de esta patología hepática.

La colestasis en la rata, tanto macro- como microquirúrgica, produce una intensa proliferación ductular biliar acompañada de fibrosis y de un moderado grado de infiltración inflamatoria portal y de muerte hepatocitaria por necrosis y/o apoptosis. Las células estrelladas y los miofibroblastos hepáticos, que protagonizan la respuesta inflamatoria intrahepática se activan y proliferan precozmente, ya a los cinco días, tras la ligadura del colédoco en la rata. Posteriormente, a las tres semanas de evolución postoperatoria, cuando la fibrosis hepática y la proliferación de células epiteliales biliares son ya muy intensas, se produce una marcada hiperplasia y degranulación de células cebadas en el hígado. En este periodo evolutivo, las células inflamatorias que infiltran el área esplácnica y las células cebadas, que infiltran los tractos portales, liberan múltiples mediadores pro-inflamatorios y pro-fibrogénicos que agravan las respuestas inflamatorias esplácnica y sistémica, así como la transformación fibrótica del hígado en la cirrosis biliar experimental.

La realización de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata permite obtener un nuevo modelo de fibrosis hepática con mayor supervivencia a largo plazo (8-10 semanas), lo cual le dota de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. En este sentido, la administración del fármaco anti-inflamatorio ketotifén desde la sexta semana de evolución postoperatoria, cuando la fibrosis biliar hepática está completamente establecida, al inhibir la degranulación de las células cebadas que infiltran el hígado, disminuiría la liberación esplácnica y hepática de mediadores inflamatorios y profibrogénicos y conseguiría reducir y/o revertir la fibrosis biliar secundaria a colestasis en la rata, así como sus principales complicaciones.

OBJETIVOS

1. En un modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica se pretende demostrar el efecto beneficioso conseguido mediante el tratamiento en una fase evolutiva tardía del postoperatorio (seis semanas) con ketotifén, un fármaco antiinflamatorio estabilizador de las células cebadas.
2. El tratamiento con ketotifén en dicho modelo experimental reduciría la insuficiencia hepática, el grado de hipertensión portal y de vasculopatía venosa mesentérica, así como las alteraciones macroscópicas esplácnicas, entre las que destacan la ascitis.
3. El tratamiento con ketotifén modularía la concentración esplácnica de mediadores pro- y anti-inflamatorios vinculados a respuestas de tipo Th1, Th2 y Th17 así como la disminución de las complicaciones secundarias a la colestasis extrahepática en la rata.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.A. ANIMALES

Se utilizaron 104 ratas macho adultas de la cepa Wistar procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación que posee Harlan Interfauna Ibérica S.L. Sant Feliu de Codines (Barcelona). Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*, y su peso corporal oscilaba entre 215 y 335 gramos ($260,934 \pm 38,754$ g). Para su estudio, las ratas se asignaron aleatoriamente a uno de los cuatro grupos siguientes:

1. **Serie I:** Animales sacrificados entre las 8 y las 9 semanas de evolución p.o.
 - **Grupo PSO-9 (n=15):** animales pseudooperados a los que se realiza laparotomía media y disección del colédoco.
 - **Grupo CMQ-9 (n=20):** animales con colestasis microquirúrgica extrahepática.
2. **Serie II:** Animales sacrificados a las 6 semanas de evolución p.o.
 - **Grupo PSO-6 (n=20):** animales pseudooperados a los que se realiza laparotomía media y disección del colédoco.
 - **Grupo CMQ-6 (n=20):** animales con colestasis microquirúrgica extrahepática.
3. **Serie III:** Animales sacrificados entre las 8 y las 9 semanas de evolución p.o. y tratados con ketotifén.
 - **Grupo PSO-KTF (n=15):** animales pseudooperados a los que se administra ketotifén (10mg/kg/día) disuelto en el agua de bebida.
 - **Grupo CMQ-KTF (n=14):** Animales con colestasis microquirúrgica extrahepática, y a los que se administra ketotifen (10mg/kg/día) disuelto en el agua de bebida.

1.B. INSTALACIONES

1.B.1. Animalario

El transporte desde el proveedor se realizó en las condiciones establecidas en la normativa vigente sobre comercio, sanidad y bienestar animal, es decir en un medio adecuado y en contenedores homologados.

La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el Animalario que la Universidad Complutense de Madrid (UCM) posee en la Facultad de Medicina. Dicho Animalario es un Centro de Asistencia a la Investigación con registro nº 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (R.D. 1201/2005).

El Animalario de la UCM cuenta con instalaciones óptimas homologadas para la cría, mantenimiento y cuarentena de animales de experimentación, así como también con instalaciones propias para la investigación, quirófanos y laboratorios anejos para la manipulación y toma de muestras y alojamiento de roedores durante el postoperatorio.

Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro dentro de cajas de plexiglás de 42x65x15 cm (Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona).

1.B.2. Unidad de Microcirugía

La técnica quirúrgica en la que se fundamenta el modelo se realizó en la Unidad de Microcirugía de la Facultad de Medicina de la UCM, en una sala que dispone de:

- Mesa de trabajo de 80 x 100 cm y sillas.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.
- Lámpara Fase de brazo doble adaptable, con una bombilla de 100 watios Osram Concentra.
- Centrífuga refrigerada superspeed Du Pont Instrument (GIRALT Sorval® RC-5B).

- Balanza precisión para pesado de los animales Jadever LPW-1260 nº certificado PM-245/04 (Jadever Scale Co.LTD, Taiwan).
- Arcón congelador Koxka a -80 °C.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC nº serie 211069.
- Contenedores desechables de residuos biológicos cortantes y punzantes.

1.B.3.Sala de sacrificio y procesado de muestras

Dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos cortantes y punzantes.
- Centrífuga.
- Contenedor de nitrógeno líquido.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.
- Recipiente para inmersión de muestras en nitrógeno líquido.
- Pinza para inmersión de las muestras.

1.B.4.Área de conservación de muestras

Se realizó en un espacio habilitado para ese fin en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid en un congelador que conserva las muestras a -80°C.

1.B.5.Eliminación de residuos biológicos

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (Electrolux Home Products España, S.A. Madrid). La eliminación y destrucción de los residuos biológicos fue llevada a cabo por la empresa CONSENUR SL.

1.C. FÁRMACOS

1.C.1. Anestésicos

- Ketamina (Imalgene® 1000. Laboratorios Merial, S.A.).
- Xilacina (Rompun® solución 2%. Bayer HealthCare).

1.C.2. Ketotifén

- Ketotifén: fumarato de (4-(1-metil-4-piperidileno)-4H-benzo [4,5] ciclohepta [1,2-b] tiofen-10(9H)-uno (*Sigma Chemicals, St Louis, USA*).

1.C.3. Otros fármacos

- Ceftriaxona (D.C.I.) (sódica), 500 mg. (Ceftriaxona Normon 500mg EFG Lab. Normon S.A. Madrid).
- Fitomenadiona, vit. K 1 ampollas 1,0 ml con 10 mg (Konakion® mm Roche Farma, S.A. Madrid).
- Buprenorfina (Buprex®).

1.D. MATERIAL

1.D.1. Instrumental quirúrgico

1. D.1.A Pinzas

- Clamp de paños Backhaus de 13.3 cm (2).
- Disección con dientes de 13cm (1).
- Disección de Adson con dientes de 12cm (1).
- Pinza de Halsted mosquito curva sin dientes de 12.7 cm (2).
- Pinza de Halsted mosquito recta sin dientes de 12.7 cm (2).
- Pinza de Heiss recta (1).
- Pinza de Heiss curva (1).
- Pinza de microcirugía recta de 10.5 cm. (1).
- Pinza de microcirugía curva de 10,5 cm.(1).

1. D.1.B Porta-agujas Mayo-Hegar de 12,7 cm. (1).

1. D.1.C Tijeras

- De Metzenbaum curva de 14 cm (1).
- De Mayo recta de 14cm (1).
- Tijera de microcirugía recta de 15 cm. (1).

1.D.2. Material de sutura y ligadura

- Seda trenzada como ligadura 3/0 Silkam®. B. Braun España.
- Seda negra trenzada como ligadura 7/0 Silkam®. B. Braun España.
- Sutura de vicryl (poliglactina 910) aguja curva 3/0. Ethicon Inc.
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 4/0 Silkam®. B. Braun España.

1.D.3. Material quirúrgico complementario

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo. Talla 7 ½ (King® Amebil S.A. Vizcaya. España).
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla 7 ½ (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK).
- Gasas de 10 × 10cm . (Envase de 10 unidades Texpol® .Manresa. España).
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del Bages S.A. Barcelona. España).

1.D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras

- Guantes de protección frente a mordedura de animales.
- Bloque de plastilina de 10 × 2 × 3 cm.
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml BD Discardit® II (Becton Dickinson S.A. Fraga. Huesca. España).

- Aguja de tipo Luer 20G 0,91×25,4 mm (*monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA*).
- Aguja de tipo Luer 21G 0,82×38,1 mm (*monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA*).
- Aguja de tipo Luer 25G 0,51×15,8 mm (*monoject magellan Safety Needle . Tyco Healthcare Group LP.USA*).
- Hoja de bisturí de acero estériles del nº 11 (*Albion Surgical Limited. Sheffield. England*).
- Solución salina isotónica: NaCl, 0.9 g/100ml. Envase 10 ml B.Braun.
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1,8 litros (Sanipick Plastic SA. Madrid)
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos.
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España).
- Guantes de protección frente frío Midera 10 .

1. D.5. Material de laboratorio

- Pipetas Pasteur de 1 ml.
- Micropipetas JENCONS automáticas variables de 0.5-10 µl, 5-50 µl, 200-1000 µl (Labssystem) y puntas de pipetas desechables (Labcenter).
- Tubos de centrifuga 10ml (BD Vacutainer®. BD Vacutainer Systems. Plymouth. UK).
- Microtubos para muestras de suero (Eppendorf Ibérica, S.L. Madrid).

- Tubos de polipropileno de 50 ml para muestras de tejido (BD Falcon® Nueva York. USA).

1. E. EQUIPOS DE LABORATORIO

1. E.1. Procesado de muestras

- Centrífuga angular Nahita modelos 2610 ref. 2610000 OF.
- Balanza analítica de precisión AB 204 Mettler Toledo nº serie: 1113043273 (Mettler-Toledo S.A.E. L'Hospitalet de Llobregat Barcelona).

1. E.2. Estudio bioquímico en suero

- Autoanalizador Olympus AU400 nº serie 311267. Olympus Optical España S.A.

1.E.3. Determinación de los niveles de mediadores inflamatorios en hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos

- Homogeneizador eléctrico Polyton. (*Brinkmann Instruments, Inc. Westminster, NY. USA*).
- Sonicador.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.

1.E.4. Laboratorio de anatomía patológica

El procesado de las muestras histológicas y su posterior estudio microscópico se efectuó en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Carlos III de Madrid (SERMAS). Este centro cuenta con:

1. Laboratorio general:

- Mesa de tallado de órganos con aspiración.
- Procesador automático de tejidos con vacío.
- Estación de trabajo para inclusión.
- Teñidor automático.

- Montador automático de cubreobjetos.
- Criocentrífuga.
- Microtomos motorizados.
- Baños de flotación.
- Criostato.
- Balanzas de precisión.
- Congeladores de -20°C.
- Estufas de incubación.
- Estufas de secado.
- Vórtex.
- Agitador orbital.
- Agitadores magnéticos.
- Microscopios ópticos convencionales.
- Fotomicroscopio.
- Microscopio de fluorescencia.
- Cabina de extracción de gases.

2. Laboratorio de análisis de imagen con dos sistemas de análisis de imagen:

a)

- Microscopio motorizado Leica CTR-5000 con epifluorescencia.
- Cámara digital Leica DC-300.
- Cámara digital Leica DC-350F.
- Software Leica Qwin V3.
- Impresora HP Photosmart 7960.

b)

- Microscopio Nikon Labophot 2 con epifluorescencia.
- Cámara de vídeo b/n Hitachi KP-140.
- Cámara de vídeo color Hitachi KP-C503.
- Software MIP4 de C.I.D.
- Impresora laser Epson EPL-6100.

Equipamiento común:

- Cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 950.
- Videoimpresora Mitsubishi.
- Videocopiadora Polaroid.
- Sistema macro para fotografía.

1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO

1.F.1. Estudios bioquímicos en suero

- **Bilirrubina total y directa:**

- *Total Bilirubin Olympus System Reagent y Direct Bilirubin Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112).*
- *Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).*

- **Aspartato aminotransferasa (AST)**

- *AST Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6109).*
- *Pyridoxal phosphate liquid (P5P) (Olympus Irlanda ref. 60106).*
- *Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).*

- **Alanina aminotransferasa (ALT)**

- *ALT Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. SR6107).*
- *Pyridoxal phosphate liquid (P5P) (Olympus Irlanda ref. 60106).*
- *Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).*

- **γ - glutamiltransferasa (GGT)**
 - GGT Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6120).
 - Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Lactato deshidrogenasa (LDH)**
 - LDH Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6126).
 - Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Fosfatasa alcalina (FA)**
 - ALP Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6104).
 - Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Ácidos biliares**
 - Kit de método enzimático colorimétrico de ácidos biliares (*Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863*).

- **Albúmina**
 - Albumin Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6102).
 - Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Creatinina**
 - Creatinin Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6178).
 - Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).

- **Urea**

- Urea Olympus System Reagent (Olympus Irlanda ref. OSR6134).
- Olympus System Calibrator (Olympus Irlanda ref. 66300).

1.F.2. Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*calcitonin gen related peptide, CGRP*) e interleuquina-13 en líquido ascítico

- **Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)**

Rat CGRP Enzyme Immunoassay Kit (ELISA) (SPI Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France).

- **Interleuquina 13 (IL-13)**

Rat IL-13 Enzyme Immunoassay Kit (ELISA) (Biosource, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain).

1.F.3. Niveles de citoquinas en hígado, íleon y ganglios linfáticos mesentéricos

- Tampón de lisis que contiene 1 mmol/l de fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; *Sigma Chemical Company*), y 1 µg/ml de pepstatina A (*Sigma Chemical Company*), aprotinina (*Sigma Chemical Company*), antipaina (*Sigma Chemical Company*) y leuceptina, en tampón fosfato a pH 7,2 (*Biofluids, Rockville, Md.*) conteniendo un 0,05% de azida sódica (*Sigma Chemical Company*).
- *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) kits* para TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A, *Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1)*, Factor de Crecimiento transformador beta 1 (*Transforming Growth Factor β 1; TGF- β 1*) y Factor de crecimiento de endotelio vascular (*Vascular endothelial growth factor; VEGF*) (DIACLONE SAS, Besançon, Francia).

1.F.4. Reactivos para estudio histológico

- Fijación

- Formol tamponado al 10%.

- Inclusión

- Agua destilada.
- Alcohol etílico (70°,96°,100°).
- Xilol.
- Parafina.

- Tinción de Hematoxilina-Eosina

- Hematoxilina de Harris:
 - Agua destilada 400ml.
 - Glicerina 100ml.
 - Iodato potásico 0,1ml.
 - Sulfato aluminico potásico 20g.
 - Hematoxilina 0,5g.
- Eosina 1g.
- Agua destilada 100ml.

- Tinción de Rojo-Sirio

- Solución Picro-RojoSirio 0,1% (Swet et al. 1964):
 - Pícrico acuoso saturado 250ml.
 - Rojo-Sirio F3B 0,5 g.
- Solución Picro-Fast green:
 - Pícrico acuoso saturado 250ml
 - Fast green 0,5 g.
- Agua destilada.

2. MÉTODOS

2.A. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio, por la cual España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos. Se ha incorporado a nuestro ordenamiento legal con fecha de 10 de Octubre de 2005 en el R.D. 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (B.O.E.nº 252, viernes 21-10-2005) (Aller et al. 2009a).

Los animales se mantuvieron en cajas de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Letica. España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona), en condiciones estables de luz y oscuridad, distribuidos en ciclos de 12 horas (de 8 a 20 horas y de 20 a 8 horas respectivamente), a una temperatura ambiente de 22 ± 2 °C y con una humedad relativa de 65-70 %. Un sistema de aire acondicionado garantizó la renovación y la climatización del aire. Se alimentaron con una dieta sólida estándar para roedores de laboratorio (rata AO4 dieta de mantenimiento: 17,6% proteínas, 43,3% almidón 2,5% lípidos, Panlab, España) y agua *ad libitum*) (Aller et al. 2009a).

2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las ratas fueron agrupadas aleatoriamente para su estudio en los siguientes grupos:

Serie I: Animales sacrificados entre las 8 y las 9 semanas de evolución p.o.

- **Grupo PSO-9 (n=15):** animales pseudooperados a los que se realiza laparotomía media y disección del colédoco.
- **Grupo CMQ-9 (n=20):** animales con colestasis microquirúrgica extrahepática.

Serie II: Animales sacrificados a las 6 semanas de evolución p.o.

- **Grupo PSO-6 (n=20):** animales pseudooperados a los que se realiza laparotomía media y disección del colédoco.
- **Grupo CMQ-6 (n=20):** animales con colestasis microquirúrgica extrahepática.

Serie III: Animales sacrificados entre las 8 y las 9 semanas de evolución p.o. y tratados con ketotifen.

- **Grupo PSO-KTF (n=15):** animales pseudooperados a los que se administra ketotifen (10mg/kg/día) disuelto en el agua de bebida.
- **Grupo CMQ-KTF (n=14):** Animales con colestasis microquirúrgica extrahepática, y a los que se administra ketotifen (10mg/kg/día) disuelto en el agua de bebida.

2. C. TÉCNICA ANESTÉSICA

El principal objetivo de la anestesia cuando se utilizan animales de laboratorio es de carácter ético y consiste en evitarles el dolor y el sufrimiento innecesarios. Independientemente del método anestésico elegido por cada grupo de Investigación, debe conseguir suficiente relajación muscular para que la cirugía pueda ser realizada fácilmente, debe bloquear la actividad refleja para impedir la activación del Sistema Nervioso Autónomo y, por lo tanto alteraciones de la frecuencia y el ritmo cardíaco y, lo más importante, la técnica anestésica debe procurar un grado suficiente de pérdida de conciencia por hipnosis que, unido a la analgesia, impida que el animal sufra dolor. En definitiva, el objetivo fundamental de la anestesia es causar a los animales de experimentación el mínimo estrés físico y psicológico asociado a la cirugía experimental (Aller y Nava, 2009).

Entre los múltiples métodos de anestesia descritos en la rata los fundamentales son los que utilizan la vía inhalatoria o la parenteral. Respecto de ésta última vía, en la última década se ha generalizado en roedores la administración de combinaciones de fármacos y, en particular la asociación del anestésico disociativo ketamina con el analgésico alfa-2 agonista xilacina para aquellas intervenciones quirúrgicas de duración

media (de 10 a 60 minutos) en las que se precisa un plano de anestesia quirúrgica profunda (Aller y Nava, 2009). Por éstas razones en el presente trabajo la inducción y el mantenimiento anestésico se realizaron mediante la administración intraperitoneal de una mezcla de ketamina (80 mg/Kg) y xilacina (12 mg/Kg). (Aller y Nava, 2009).

2. D. TÉCNICA QUIRÚRGICA DE PSEUDO-OPERACIÓN

Con la rata en decúbito supino se realiza una laparotomía media xifopubiana, las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%), y son desplazadas hacia el lado izquierdo del animal. A continuación y, tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorsolumbar, se secciona el ligamento falciforme, situado entre los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y caudado, y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.

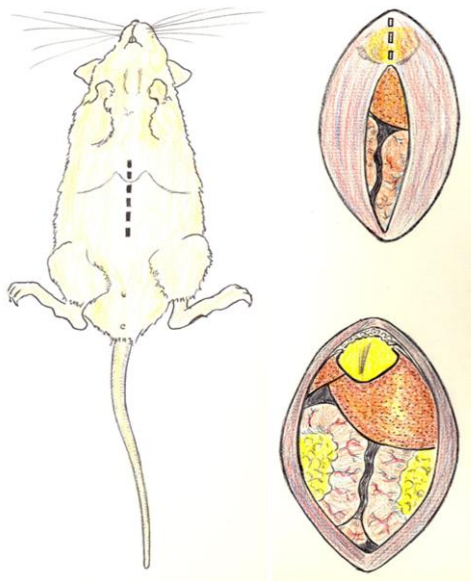


Figura: 4. Laparotomía media e Incisión peritoneal apreciándose el hígado y las asas de intestino delgado.

Las maniobras anteriores permiten una exposición adecuada del hilio hepático y la tracción ligera del duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar, que es la estructura hiliar más superficial en la rata (Lorente et al. 2009).

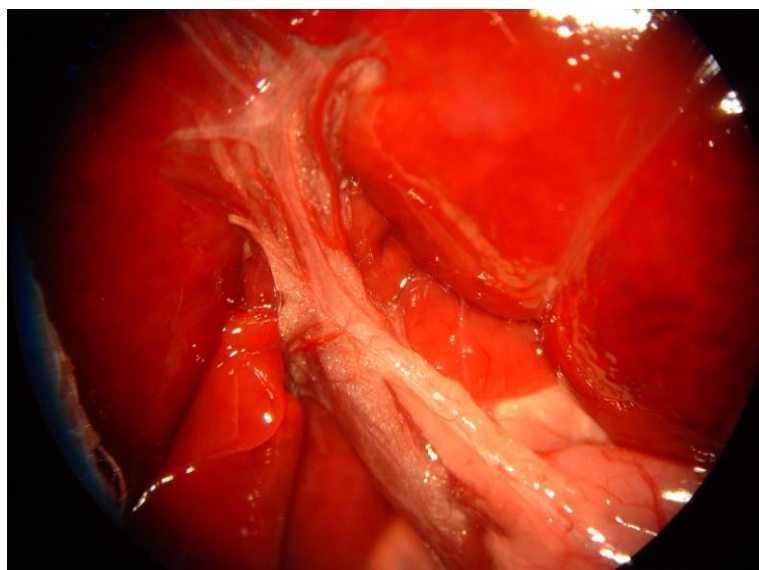


Figura 5. *La vía biliar extrahepática es anterior respecto de las ramas de la arteria hepática y éstas a su vez son anteriores respecto de las ramas portales.*

Tras disecar el colédoco, se introduce el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en 2 planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible vycril® (polyglactin 910) de 4/0, y piel con sutura continua de seda de 4/0. (Lorente et al. 2009).

2. E. TÉCNICA DE COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXTRAHEPÁTICA

El parénquima hepático en la rata está constituido por cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) y cada uno de ellos posee una vascularización portal y arterial y un drenaje venoso y biliar independientes (Lorente et al. 2009). Esta característica anatómica permite resecar los conductos biliares que drenan cada lóbulo hepático en continuidad con el colédoco mediante la utilización de una técnica microquirúrgica (Aller et al. 1993; Aller et al, 2009b).

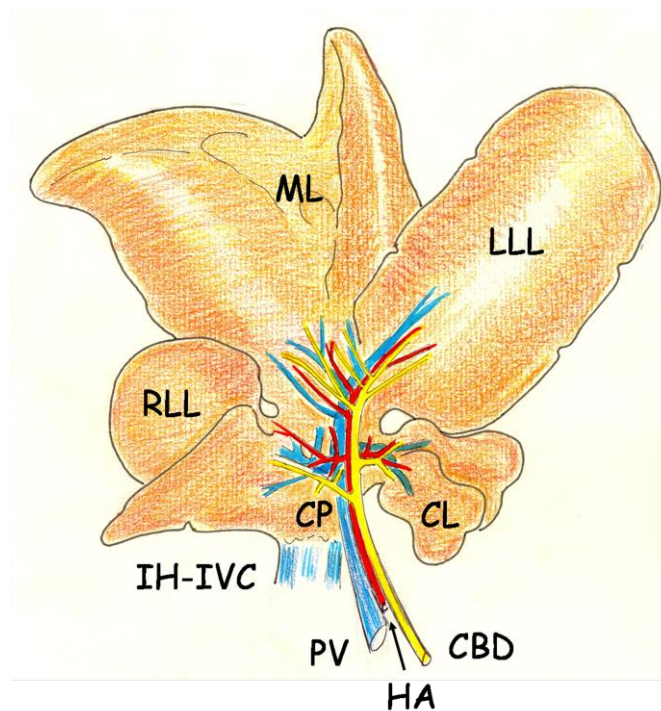


Figura 6: Anatomía del hígado de la rata. ML: Lóbulo medio, LLL: Lóbulo lateral izquierdo, RLL: Lóbulo lateral derecho, CL: Lóbulo caudado, CBD. Vía biliar, HA: arteria hepática, PV: vena porta.

Tras anestesia mediante inyección intramuscular de ketamina (80mg /Kg) y xilacina (12 mg/Kg), con el animal en decúbito supino, se realiza una laparotomía media xifopubiana.

A continuación se extraen las asas intestinales, desplazándolas hacia el lado izquierdo del animal y se protegen con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%). Después de colocar un bloque de plastilina en la zona dorso-lumbar los lóbulos hepáticos superiores se evierten sobre el tórax y también se cubren con una gasa empapada en suero salino. Estas maniobras permiten una correcta exposición de la totalidad de la vía biliar extrahepática. A continuación se seccionan el ligamento falciforme y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho.

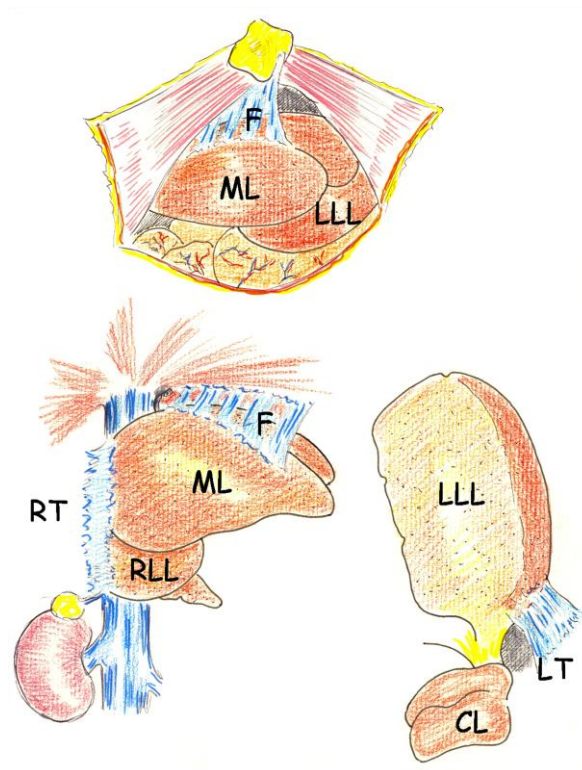


Figura 7: Anatomía del hígado de la rata. F: Ligamento falciforme, RT: Ligamento triangular derecho, LT: Ligamento triangular izquierdo, ML: Lóbulo medio, LLL: Lóbulo lateral izquierdo, RLL: Lóbulo lateral derecho, CL: Lóbulo caudado

Para las siguientes fases de la intervención es necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación (Aller y Arias, 2009), ya que la disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal o arterial de estos lóbulos.

La tracción del duodeno hacia la izquierda del animal permite visualizar el colédoco, que se liga y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática. Esta maniobra, al producir dilatación de la vía biliar extrahepática, facilita la identificación y posterior disección del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata. El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se disecciona hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC.



Figura 8. Doble Ligadura y sección del colédoco en su porción yuxtapancreática.

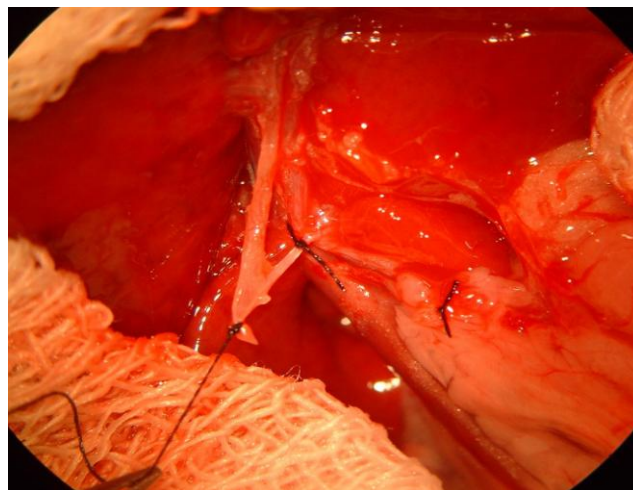


Figura 9. Tracción del colédoco y ligadura de los conductos biliares procedentes del lóbulo caudado (LC).

Después de disecar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático. La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma.

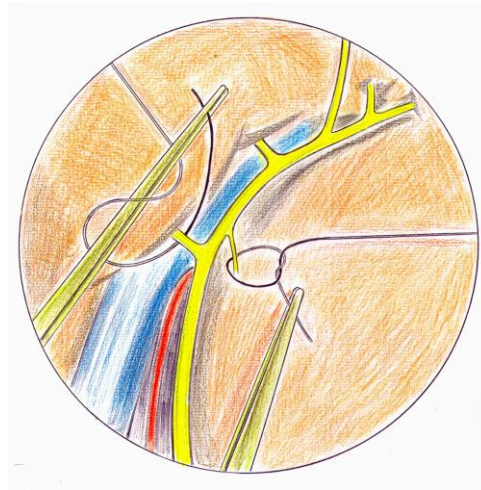


Figura 10: Ligadura para la posterior sección del conducto biliar del LLD y LC. En rojo, la arteria hepática y en azul la vena porta.

Se continúa la disección del colédoco en sentido craneal, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, e individualizándolo de la arteria hepática, y de la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del lóbulo medio (LM). Estos últimos se disecan y se ligan independientemente. Por último, se diseca, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI (Aller y cols., 1993; Aller y cols., 2009b).

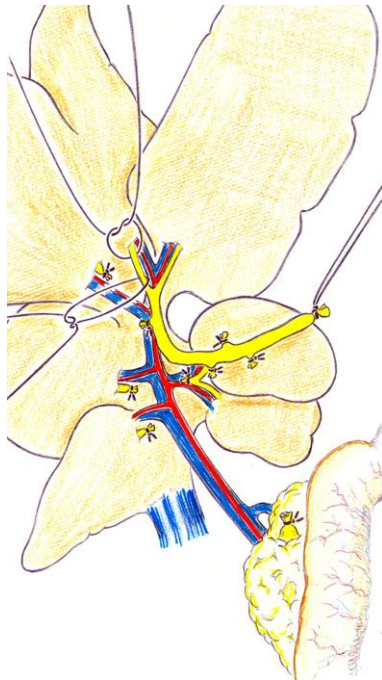


Figura 11: Finalización de la disección de la vía biliar con la ligadura y posterior sección de las ramas de los lóbulos medio y lateral izquierdo.

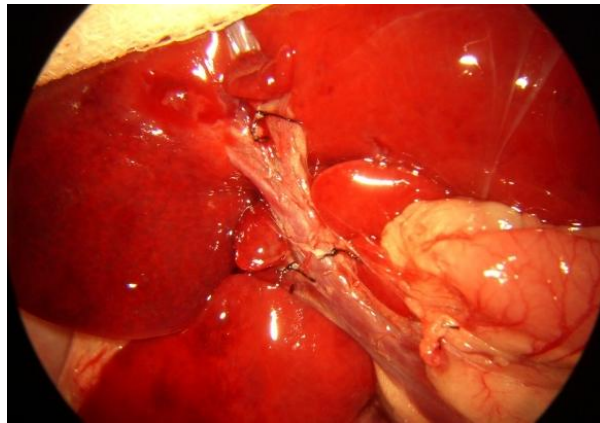


Figura 12: *Vía biliar extirpada apreciándose la indemnidad de la arteria hepática y la vena porta, así como de sus ramas lobulares.*

Previo comprobación de la integridad de la vascularización portal y arterial de los lóbulos hepáticos (figura 18), así como de la inexistencia de sangrado procedente de alguna lesión inadvertida del parénquima hepático, se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con continua reabsorbible vycril[®] (polyglactin 910) de 4/0, y de la piel con sutura continua de seda de 4/0.

2. F. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención las ratas se colocan en una caja de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Letica. España) sobre un lecho de viruta especial para roedores de laboratorio (Panlab), que permite su estabulación en un medio limpio y seco, con luz poco intensa y en un ambiente tranquilo hasta que se recuperan de la anestesia. Debido a la especial sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1989; Aller y Nava, 2009), la prevención de la hipotermia postoperatoria es de fundamental importancia. Por ello, inmediatamente después de la intervención el animal se colocó cerca de una fuente de calor (una lámpara) sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal en el rango aconsejado para las ratas adultas (25-30°C) (Waynforth y Flecknell, 2004).

Además en los roedores, es importante controlar la respiración durante el postoperatorio inmediato ya que es común la depresión respiratoria durante este periodo. Esta complicación es especialmente

peligrosa pues suele pasar inadvertida hasta que los animales sufren hipoxia e hipercapnia.

Durante una intervención quirúrgica, en particular si como en éste modelo experimental se realiza una laparotomía, se pierden abundantes fluidos por evaporación, lo cual se agrava debido a que las ratas generalmente son incapaces de ingerir líquidos durante las primeras 12-24 horas del p.o. Por tanto, se deben aportar aproximadamente 40-80ml/kg/24h preferiblemente por vía oral si el animal ha recuperado la conciencia. En caso de que no se hayan recuperado del íleo paralítico se administra una solución salina-dextrosa (4% dextrosa, 0.18% salino) o salina (0.9%) por vía intraperitoneal o subcutánea (Aller y Nava, 2009).

La realización de una laparotomía con manipulación de las asas intestinales y resección de la vía biliar en la rata cursa con un importante dolor p.o. En particular, las ratas Wistar tras sufrir una laparotomía adoptan posturas sugerentes de dolor abdominal arqueando la espalda, aumentan su frecuencia respiratoria y reducen la ingesta de líquidos y sólidos. Por éste motivo, como terapia analgésica se administró el opioide buprenorfina (0.05mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas de p.o. (Aller y Nava, 2009). Buprenorfina ha sido muy utilizado en medicina veterinaria durante las últimas tres décadas porque proporciona un nivel de analgesia excelente y produce una mínima depresión cardíaca y/o respiratoria

Los animales fueron sacrificados a las 8-9 semanas (series I y III) y a las 6 semanas (serie II) del período post-operatorio, durante el cual se les administró por vía i.m. profunda un antibiótico de amplio espectro (ceftazidima; 50 mg/kg; dos veces a la semana) y vitamina K1 (fitomenadiona; 8mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente (Aller y cols. 2009b).

Ketotifén, un fármaco estabilizador de la membrana de los mastocitos, se administró en el agua de bebida tras ser disuelto a una concentración de 0.15mg/ml que aporta una dosis del fármaco de 10mg/kg/día (Serna y cols. 2006) desde la sexta semana del p.o. hasta que las ratas fueron sacrificadas la 8ª-9ª semana del p.o. Se comprobó diariamente la cantidad de agua ingerida por cada rata para asegurar que estaban recibiendo

niveles terapéuticos del fármaco (dosis umbral terapéutica de 10mg/Kg/día, por lo que eran necesarios 16,6 ml/día para una rata de 250g). Las ratas que ingerían menos agua de la necesaria para mantener niveles plasmáticos terapéuticos de ketotifén fueron rechazadas para el estudio.

2. G. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Concluido el tiempo de evolución previsto para su estudio (8-9/6 semanas), se procedió a la anestesia de los animales con ketamina (80 mg/kg) y xilacina (12 mg/kg) por vía intraperitoneal para su estudio y posterior sacrificio. Tras laparotomía media, el líquido ascítico es aspirado con una jeringa estéril, se mide su volumen y se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos para separar las células peritoneales. A continuación, se divide en tres alícuotas y se conserva a -42 °C hasta su utilización para determinar diferentes mediadores.

2.G.1. Determinación de la presión venosa portal

La presión venosa portal puede ser medida por un método directo o indirecto. En el primer caso, tras la anestesia, se realiza una laparotomía media y se procede a su medición por canulación de la vena ileocólica o de una pequeña vena ileal con un catéter PE 50, fijando el catéter con una gota de cianoacrilato para que la punta del catéter se fije en la parte distal de la vena mesentérica superior (Bernadich C. et al., 1998).

También es posible la medición indirecta de la presión portal por punción intraesplénica, insertando una aguja 20G en el parénquima esplénico (Figura 13). El catéter se conecta en ambos métodos a un registrador de presión Powerlab 200 (ML 201) con un transductor de presión Sensor (SN-844), asociados a un programa de ordenador Chart V 4.0 (ADI Instruments) (Figura 13). El sistema se calibra antes de cada experimento.

Se ha demostrado una excelente correlación entre la presión en la pulpa esplénica y la presión portal medida en la vena mesentérica superior (Kravetz et al., 1986). Por ello, el método empleado en nuestro caso fue el de medición por punción intraesplénica (Figura 13).



Figura 13. Punción intraesplénica insertando una aguja 20G en el parénquima esplénico para medir indirectamente la presión portal, previa conexión a un transductor de presión cuyo registro lo realiza un sistema informático.

2. G. 2. Circulación venosa colateral

Tras laparotomía media y determinación de la presión venosa portal, se procedió a la observación del territorio esplácnico, estudiando las áreas en las que se desarrolla la circulación venosa colateral en la rata. Esta circulación colateral puede ser de dos tipos: portosistémica o portohepática.

- CIRCULACIÓN COLATERAL PORTOSISTÉMICA

- **Área esplenorrenal:** Se forman la vena **esplenorenal craneal** (anterior o proximal), y la **esplenorrenal caudal** (posterior o distal), que drenan a distinta altura en la vena suprarrenal izquierda (figura 14).

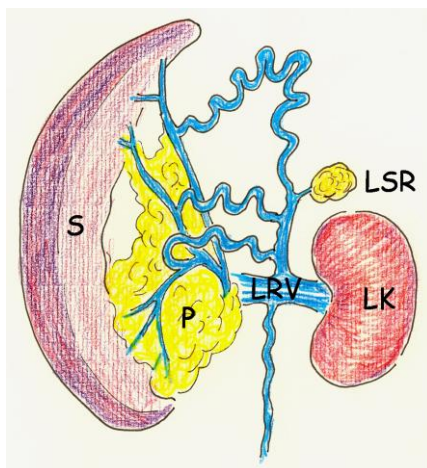


Figura 14: Circulación colateral esplenorrenal.

- **Área gastroesofágica:** Las colaterales paraesofágicas son dos venas tortuosas y de grueso calibre que ascienden por la cara anterior y posterior del esófago: **paraesofágica anterior y posterior** (Figura 15).

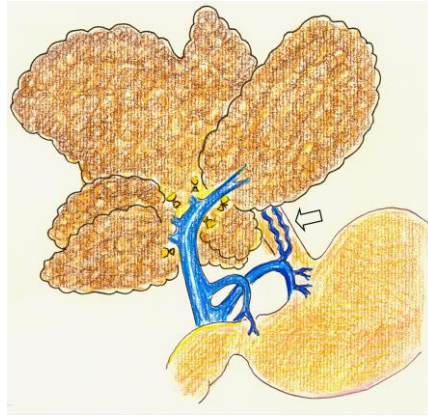


Figura 15: Vasos colaterales paraesofágicos.

- **Área colorrectal:** Se localiza la vena mesentérica inferior, que se continúa con las **venas hemorroidales** en situación pararrectal izquierda (Figura 16).

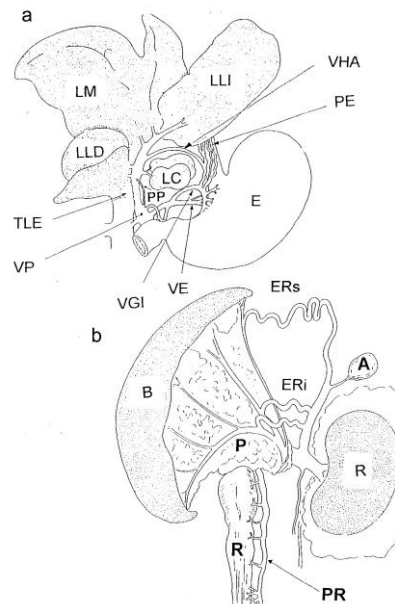


Figura 16. Representación esquemática de la circulación colateral esplácnica en ratas. a) colaterales paraesofágicas (PE) y paraportales (PP). La vena hepática accesoria (VHA) se localiza entre los lóbulos lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC). b) colaterales portosistémicas espleno-renal superior o craneal (ERs) e inferior o caudal (ERi) y colaterales pararrectales (PR). LM: lóbulo medio; LLD: lóbulo lateral derecho; E: estómago; VGI: vena gástrica izquierda; VE: vena esplénica; B: bazo; P: páncreas; R: riñón; A: glándula suprarrenal; R: recto. (Dieguez y cols. J Inves Surg 15: 329)

CIRCULACIÓN COLATERAL PORTOHEPÁTICA

Está compuesta por:

- La **vena hepática accesoria**, que produce la revascularización portal hepática cuando alcanza el hilio (Figura 17).
- **Las venas colaterales portoportales**, que se desarrollan en el hilio hepático, son poco numerosas y su tamaño es muy pequeño para ser consideradas como una vía de revascularización hepática efectiva (Figura 17).

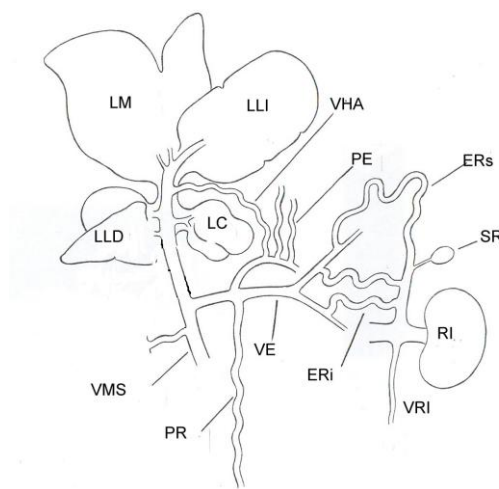


Figura 17. Tipos de circulación colateral portohepática y portosistémica. LLD: lóbulo lateral derecho hepático; LM: lóbulo medio hepático; LLI: lóbulo lateral izquierdo; LC: lóbulo caudado; VHA: vena hepática accesoria; PE: venas paraesofágicas, ERS: colateral esplenorenal superior; SR: glándula suprarrenal; RI: riñón izquierdo; VRI: vena renal izquierda. ERI: colateral esplenorenal inferior; VE: vena esplénica, PR: colateral pararrectal; VMS: vena mesentérica superior.

2. G. 3. Vasculopatía venosa mesentérica

Se denomina vasculopatía venosa mesentérica a la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Se consideran tres grados de vasculopatía venosa mesentérica (Aller et al., 2001):

- **Grado 0:** aspecto macroscópico normal de las ramas de la vena mesentérica superior.
- **Grado I:** dilatación y tortuosidad de las ramas mesentéricas, secundarias al clampaje de la vena mesentérica superior.
- **Grado II:** dilatación y tortuosidad espontáneas de las ramas de la vena mesentérica superior.

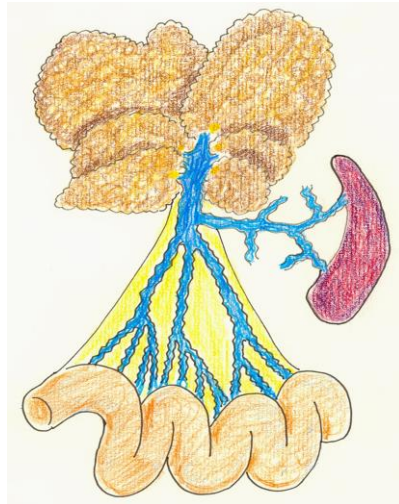


Figura 18: Vasculopatía venosa mesentérica y esplénica en relación con la cirrosis hepática.

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior (Figura 19). Esto es, las ramas de primer y segundo orden o proximales, por su vecindad con la vena mesentérica superior, y las de tercer y cuarto orden o distales, por su vecindad con el intestino (íleon y ciego) (Castañeda y cols., 2000).

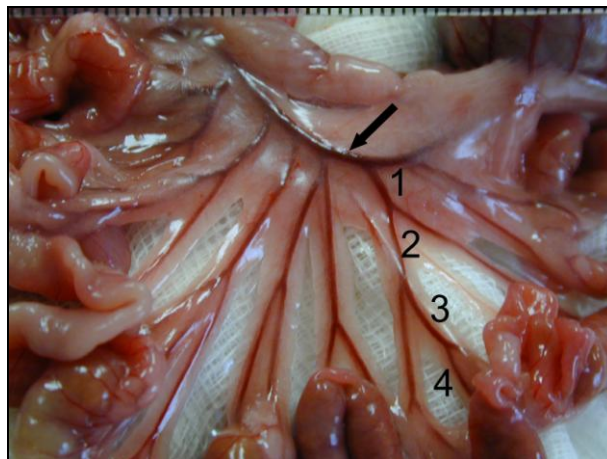


Figura 19. Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden.

2.G.4. Presencia de ascitis y valoración de los niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (*Calcitonin Gen Related Peptide*, CGRP) e IL-13 en el líquido ascítico

Para valorar las concentraciones de CGRP e IL-13 en el líquido ascítico se utilizaron técnicas *ELISA*, de acuerdo a las instrucciones aportadas por el fabricante (SPI Bio, Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France y Biosource, Invitrogen S.A., Barcelona, Spain; respectivamente).

2.G.5. Extracción sanguínea

Tras realizar un estudio macroscópico de la cavidad abdominal, medir la presión portal y valorar los signos macroscópicos sugerentes de hipertensión portal, como son el desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica y de circulación venosa colateral, se procedió a la extracción de sangre de la vena cava inferior infrahepática, obteniéndose entre 5 y 8 ml de sangre en cada animal (Figura 26). Esta maniobra deja al animal exangüe, falleciendo por shock hipovolémico. La sangre se conservó refrigerada en hielo (4°C), y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos para obtener el suero que, tras dividirse en tres alícuotas, se conservó a -42°C hasta su utilización para determinar diferentes marcadores bioquímicos.



Figura 20. Sacrificio del animal extrayendo la sangre de la vena cava inferior tras la laparotomía y exposición de las asas intestinales.

2.G.6. Recogida de muestras histológicas para determinación de mediadores inflamatorios

1. Extracción de una muestra de hígado

Una muestra del lóbulo medio (LM) hepático fue introducida en tubos Eppendorf, sumergidos en nieve carbónica, que posteriormente fueron almacenados en un congelador a -42°C hasta su estudio.

2. Extracción del Complejo Linfático Mesentérico Superior

Los ganglios que componen el Complejo Linfático Mesentérico Superior en la rata (Figura 21) se extirparon y se pesaron, y a continuación se introdujeron en tubos Eppendorf, sumergidos en nieve carbónica, que posteriormente se almacenaron en un congelador a -42°C hasta su estudio.

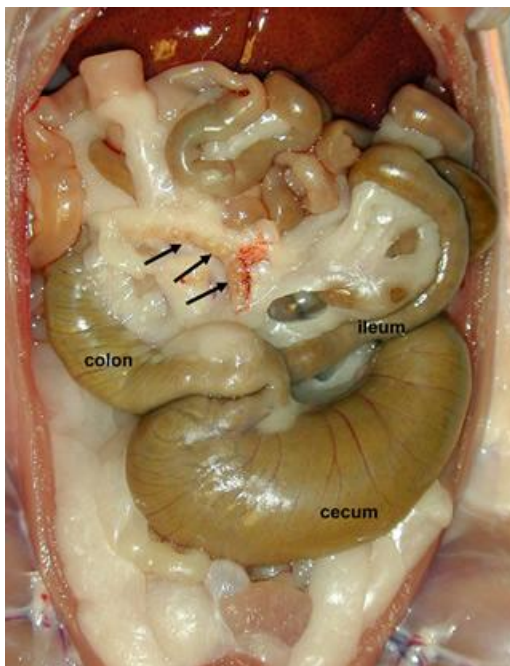


Figura 21. Anatomía del aparato digestivo de la rata. 1: Parte del duodeno; 2: Yeyuno; 3: Íleon; 4: Unión ileocecal; 5: Complejo linfático mesentérico superior; 6: Vasos sanguíneos y linfáticos del mesenterio; 7: Ciego; 8: Ápex del ciego; 9: Colon. (Olds et al., 1979).

3. Extracción del íleon

Se tomó una muestra de íleon terminal, a 1 cm de la unión ileocecal. Una vez extraído se pesó, y a continuación se introdujo en tubos Eppendorf, que se conservan en nieve carbónica y posteriormente en un congelador a -42°C hasta su estudio.

2. G. 7. Recogida de muestras para estudio histopatológico

Durante la necropsia de los animales se procedió a la resección del hígado, individualizándose sus lóbulos anteriores y posteriores, y se tomó una muestra del lóbulo medio derecho, que se transfirió a un tubo que contenía Formol al 10% para su posterior estudio histopatológico. Además, se extrajeron muestras de duodeno, yeyuno, íleon y ciego, se eliminó su contenido mediante la perfusión intraluminal de solución salina isotónica y se introdujeron en tubos que contenían formol al 10% para su posterior estudio histopatológico.

Por último, también se extirparon el bazo y los testículos para ser registrado su peso.

2.H. DETERMINACIÓN SÉRICA DE PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA

2.H.1. Bilirrubina total y directa:

Las concentraciones séricas de bilirrubina total y directa se determinaron por una técnica fotocolorimétrica, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112, respectivamente). Esta técnica consiste en una diazoreacción basada en el principio de Jendrassik y Gróf (Doumas y cols., 1985). En medio ácido la bilirrubina conjugada reacciona con una sal para formar azobilirrubina (azopigmento). Esto es lo que se denomina bilirrubina directa. Si a la muestra de suero y reactivo añadimos una sustancia aceleradora (cafeína y agentes surfactantes) conseguimos que reaccione el total de la bilirrubina, denominando a la diferencia entre la total y la directa fracción indirecta (no conjugada). La concentración de bilirrubina presente en el plasma es proporcional a la concentración de azopigmento que se produce (Higgins y cols., 2006). La utilización de un reactivo compuesto por ácido sulfanílico, ácido clorhídrico y dimetil sulfóxido (DMSO) permite la formación de azobilirrubina por una reacción de diazotación, que es de color rojo cereza. La absorbancia de la muestra se valora por espectrofotometría a una longitud de onda de 555 nm (530-580) y a 20-25°C (Matimeck y cols., 1966; Sorinson y cols., 1971; Royer y cols., 1973).

2.H.2. Transaminasas hepáticas:

Se determinaron la concentración de las transaminasas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanin aminotransferasa (ALT) utilizando un test cinético espectrofotométrico de ultravioleta optimizado según estándar de la *International Federation for Clinical Chemistry (IFCC)* (Schuman y cols., 2002a, Schuman y cols., 2002b, Schuman y cols., 2006) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Olympus Irlanda refs. OSR6109 y SR6107, respectivamente). La valoración de **AST** se fundamenta en la reacción del α -cetoglutarato y el aspartato, catalizada por la AST, transformándose en L-glutamato y oxalacetato, cuya reacción con NADH e Hidrogeniones da lugar a malato y a NAD^+ , por acción de la enzima Malato Deshidrogenasa. El método de valoración se basa en esta oxidación del NADH a NAD^+ , y se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto mediante un test U.V. cinético (normativa IFCC) a una longitud de onda de 334 nm, 340 nm y 365 nm. La técnica de determinación de la **ALT** sigue estos mismos principios, si bien en este caso los sustratos de la reacción catalizada por la ALT son el α -cetoglutarato y la L-alanina, que se convierten en L-glutamato y piruvato. Aquí, es el piruvato el que se combina con NADH e hidrogeniones para dar (por una reacción catalizada por la enzima Lactato Deshidrogenasa) Lactato y NAD^+ (Bergmeyer y cols., 1976; Bergmeyer y cols., 1978; Bergmeyer y cols., 1980; Izquierdo y cols., 1982).

2.H.3. Fosfatasa alcalina:

La fosfatasa alcalina se determina utilizando un test cinético fotolorimétrico según estándar de la *International Federation for Clinical Chemistry (IFCC)* (Olympus Irlanda ref. OSR6104), que se basa en la hidrolización de los ésteres del ácido fosfórico en medio alcalino, produciendo fosfato inorgánico y el correspondiente resto orgánico con el que se había esterificado. Para su valoración se utiliza un test cinético optimizado con el que se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto a una longitud de onda de 405 nm y a 25 °C, 30°C y 37°C, siguiendo el protocolo DGKC (Heussament

y cols., 1977; Izquierdo y cols., 1982; Tietz y cols., 1983; Tietz y cols., 1993).

2.H.4. γ - glutamil-transferasa:

Para la cuantificación sérica de las concentraciones de γ - glutamil-transferasa (GGT) se utilizó un método fotolorimétrico (*GGT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6120). GGT cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamil de un sustrato donante (γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida) a un receptor (glicilglicina), produciéndose γ -glutamilglicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. El aumento de la concentración de éste último produce cambios en la absorbancia en una longitud de onda de 410 nm, siendo por tanto la misma directamente proporcional a la actividad enzimática de GGT. (Izquierdo y cols., 1982; Schuman y cols., 2002c, Panteghini M, 2006).

2.H.5. Lactato deshidrogenasa:

Para la determinación de las concentraciones séricas de Lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó un test cinético espectrofotométrico de ultravioleta (*LDH Olympus System Reagent*, Olympus Irlanda ref. OSR6126) recomendado por el Comité Escandinavo de Enzimas (SCE). LDH es una enzima que cataliza la reducción de piruvato a lactato en un medio con pH neutro produciéndose en esta reacción la oxidación (consumo) de NADH. La concentración de NADH se monitoriza mediante la absorbancia en la longitud de onda de 340nm. La disminución en la absorbancia por minuto ($\Delta A / \text{min}$) es proporcional a los micromoles de sustrato transformado en ese periodo de tiempo y, por lo tanto es proporcional a la actividad de la LDH (*Scandinavian Committee on Enzymes*, 1974; Izquierdo y cols., 1982)

2.H.6. Ácidos biliares:

Para la determinación de las concentraciones séricas de ácidos biliares se utilizó un método cinético fotolorimétrico enzimático (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863). En una

primera reacción los ácidos biliares son oxidados por la enzima 3- α hidroxisteroide dehidrogenasa, con la subsiguiente reducción del Thio-NAD a Thio-NADH. La tasa de formación de éste último compuesto se valora midiendo los cambios en la absorbancia específica en 405 nm.

2.H.7. Proteínas totales:

Las proteínas totales se determinaron mediante el test colorimétrico "Biuret", basado en que los grupos -CO-NH- unidos entre sí dan una reacción con formación de color violeta con las sales cúpricas en medio alcalino, siendo la más representativa y simple la que da con el reactivo de Biuret. Se valora la absorbancia de la muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Es en la actualidad, constituye el método más exacto y simple para la determinación de las proteínas totales (Henry y cols., 1957; Peters y cols., 1968).

2.H.8. Albúmina:

La albúmina sérica se cuantificó mediante el test fotolorimétrico denominado "verde de bromocresol" (Olympus Irlanda ref. OSR6102), en el cual la muestra se combina con este colorante a determinado pH, produciéndose un cambio de color del indicador, que pasa de amarillo verdoso a verde azulado. La absorbancia de la muestra se valora por espectrofotometría a una longitud de onda de 630 nm a temperatura ambiente (Doumas y cols., 1971; Webster y cols., 1974).

2.H.9. Creatinina:

Las concentraciones séricas de creatinina se valoraron mediante un test químico cinético fotolorimétrico (*Creatinin Olympus System Reagent*; Olympus Irlanda ref. OSR6178), que se fundamenta en la reacción de Jaffé. La creatinina en un medio alcalino reacciona con el ácido pícrico formando un producto de color amarillo-naranja que es visible en el espectro de longitud de onda de 520/800 nm. La velocidad de cambio en la absorbancia es proporcional a la concentración de

creatinina en la muestra (Folin, 1904; Cook, 1971; Larsen, 1972; Lamb y cols., 2006).

2.H.10. Urea:

Los niveles séricos de urea fueron cuantificados con un método enzimático cinético por espectrofotometría ultravioleta (*Urea Olympus System Reagent*; Olympus Irlanda ref. OSR6134). La urea es hidrolizada en presencia de agua y de ureasa dando lugar a un ión amonio y dióxido de carbono. El amonio producido en ésta primera reacción reacciona con 2-oxoglutarato y NADH produciéndose glutamato y NAD^+ en presencia de GLDH. El descenso en la concentración de NADH produce una disminución en la absorbancia por unidad de tiempo en la longitud de onda de 340 nm que es proporcional a la concentración de urea (Sampson y cols., 1980; Lamb y cols., 2006)

2.I. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN HÍGADO, ÍLEON Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS

La determinación de las concentraciones tisulares de citoquinas se realizó mediante una técnica de inmunoensayo enzimático de tipo *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando kits comerciales específicos para rata (BioNOVA Científica Ltd., Madrid, España).

2.I.1 Homogeneización de los tejidos

Las muestras de tejido congelado se introdujeron en tubos de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, Estados Unidos) que contenían tampón de lisis a 4°C (10 ml de tampón/g de tejido). El tampón de lisis contiene fenilmetilsulfonil flúor (PMSF; Sigma Chemical Company), pepstatina A 1 μ g/ml (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company), antipaína (Sigma Chemical Company) y leuceptina en tampón fosfato a pH 7,2 con el 0,05% de azida sódica. Las muestras se homogeneizaron 3 veces durante 30 s

con un homogeneizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminster, Estados Unidos) a máxima velocidad. A continuación, las muestras son "sonicadas" 5 veces, y se congela el sobrenadante a -80°C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Tras su descongelación a 4°C se centrifugaron a 3.000 rpm y se midió el volumen final de homogeneizado con una pipeta graduada. Los homogeneizados tisulares se almacenaron a -80°C hasta la realización de la determinación cuantitativa de las citoquinas.

2.I.2. Valoración de los niveles tisulares de citoquinas

La cuantificación de los niveles tisulares de TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17A, *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), factor de crecimiento transformador beta 1 (*transforming growth factor* β 1; TGF- β 1) y Factor de crecimiento de endotelio vascular (vascular endothelial growth factor; VEGF) se realizó mediante un método *enzyme linked-immuno-sorbent-assay* (ELISA), utilizando kits específicos para rata, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (DIACLONE SAS, Besançon, Francia).

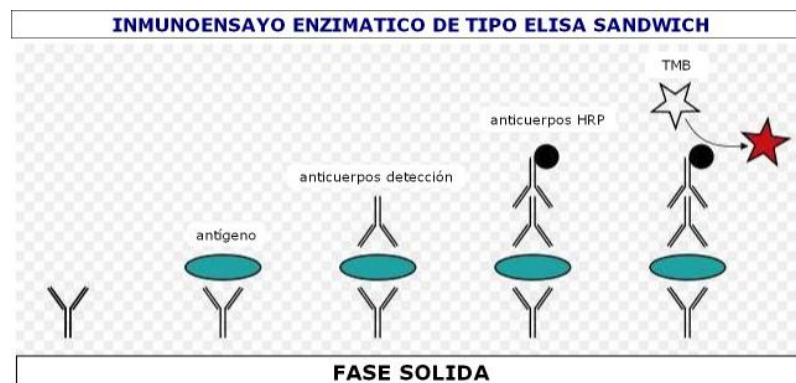


Figura 22. Formación de un "sándwich" de fase sólida constituido por Anticuerpo-Antígeno-Anticuerpos-Enzima.

2.I.3. Determinación de los niveles tisulares de proteínas

Para valorar las concentraciones de proteínas en las muestras tisulares se utilizó un método químico espectrofotométrico. Se prepara una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml en PBS. Posteriormente, se añaden a las cubetas de lectura del espectrofotómetro 2, 4, 8, 12, 16, 20 μl de

dicha solución, y se completan hasta un volumen final de 800 µl de PBS (es decir, añadiremos 798, 796, 792, 788, 784 y 780 µl de PBS). Añadimos a todas las cubetas 200 µl de reactivo de Bradford (BIO-RAD Protein Assay) y dejamos actuar 5 minutos. Posteriormente, se procede a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospect III (Pharmacia) a 595 nm., calibrándolo en blanco sin proteína, que contiene 800 µl de PBS y 200 µl de reactivo de Bradford, y se realiza la curva patrón. Para calcular la cantidad de proteína de las muestras del complejo linfático mesentérico superior (CLMS) y del íleon fue necesario hacer una dilución 1/10 en PBS, porque al estar muy concentradas, quedaban fuera de la curva patrón. Se extrapoló el valor de la absorbancia obtenida de la muestra problema sobre la curva patrón, y así se obtuvo la concentración de proteínas. Todas las muestras se valoraron como mínimo dos veces, y posteriormente se realizó la media aritmética de los valores obtenidos.

La cantidad de proteínas presente en las muestras se cuantificó mediante el método Bradford, que está basado en los cambios de color que sufre el reactivo Bradford (Azul de Coomassie) cuando se une a residuos de proteínas, concretamente a aminoácidos básicos (principalmente arginina) y a aminoácidos aromáticos.

2.J. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO

Para el estudio histopatológico se procesaron las muestras mediante técnicas de rutina para microscopía óptica:

2.J.1 Fijación

La fijación de los tejidos es indispensable para evitar los procesos autolíticos o postmortem de las células de forma inmediata, y para que las estructuras tisulares se conserven e inmovilicen. Para esto, se introdujeron los tejidos inmediatamente tras su extirpación en formol tamponado al 10%, que tiene una penetración relativamente rápida en los mismos. El tiempo de fijación para este reactivo es de 12 a 24 horas.

2.J.2. Inclusión

Tras el tallado de los órganos, las piezas seleccionadas se incluyeron en parafina mediante un sistema automático con temperatura y vacío controlado por ordenador (Histomatic 166 MP, Fisher). En este procesado automático, inicialmente, las piezas se sumergieron en una cubeta con agua destilada. Dado que la parafina no es soluble en agua, previamente a la inclusión hay que deshidratar el tejido para que ésta pueda penetrar en el mismo. Durante este proceso de deshidratación progresiva, se pasan las muestras por cubetas que contienen concentraciones crecientes de alcohol etílico: primero al 70%, después al 96% y por último alcohol absoluto (100%). El tejido se sumerge en cada cubeta 3 veces, durante 10 minutos cada vez, pasando después a la siguiente cubeta y repitiendo este proceso. A continuación, se realiza el aclarado, que es un paso necesario para que se pueda incluir el tejido en parafina, ya que ésta tampoco es soluble en alcohol. El agente más utilizado es el xilol, debido a su rápida acción, si bien se pueden utilizar también benzol o toluol. De esta forma, se sustituye el alcohol etílico (deshidratante) por xilol (sustancia miscible con la parafina), de forma que la parafina se pueda disolver y penetrar en el tejido. Finalmente, en la estación de inclusión, se procedió a la obtención de los bloques de parafina sólidos con la pieza de tejido en su interior. Para ello, se impregna el material en parafina blanda a 46°C durante 1 hora, tiempo tras el cual se realiza un segundo baño en parafina dura a 58°C durante 1 hora. Por último, se coloca la muestra en una cubeta, se vierte la parafina dura fundida en su interior, y se enfría en hielo.

2.J.3. Procesado de los cortes

Tras la inclusión, se procedió a realizar el corte de las piezas con un microtomo de parafina tipo Minot (Microm), obteniéndose secciones de 4 a 7 μm de grosor. A continuación, las secciones colocadas en un portaobjetos e identificadas se sometieron a un proceso de desparafinado. Para esto, se somete a las preparaciones a tres baños de 3 a 5 minutos en xilol. Posteriormente, se han de hidratar para que

los colorantes puedan actuar. Esto se hace utilizando alcohol en concentraciones decrecientes (absoluto, 96 % y 70%) y, finalmente, agua destilada. Las muestras han de estar sumergidas en cada baño entre 3 y 5 minutos.

2.J.4. Tinción y montaje

Finalmente, se llevó a cabo la tinción de las preparaciones con Hematoxilina-Eosina, y Tricrómico de Masson para la posterior observación al microscopio óptico de las diferentes muestras tisulares. Una vez teñidos con los protocolos que se indican a continuación, se debe extraer el agua de la preparación para evitar la opacidad del tejido. La deshidratación se lleva a cabo por alcoholes de gradación creciente. A continuación, se realiza un aclarado con xilol, que disminuye el contraste de los índices de refracción de los componentes de los tejidos y, para finalizar, se procede a su montaje, colocando una gota del medio de montaje (bálsamo de Canadá o un medio sintético) sobre el corte, apoyando y presionando sobre éste el cubreobjetos para eliminar las burbujas. Por último, se limpia el medio de montaje excedente y se deja secar.

2.J.4.a. Hematoxilina-Eosina:

Es una tinción general que nos proporciona una visión global de las estructuras tisulares. Los portaobjetos con las secciones desparafinadas se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 10 minutos, y después se lavaron en agua destilada durante otros 10 minutos. A continuación se sumergieron en eosina unos segundos, se lavaron con agua destilada de nuevo y se procedió a su deshidratación en alcoholes y montaje.

2.J.4.b. Tricrómico de Masson:

Se ha utilizado para poner de manifiesto las diferentes capas: muscular, tejido conectivo y, además es un colorante que tiene gran afinidad por el tejido fibroso. Los cortes ya hidratados se sumergen en hematoxilina férrica de Weigert's durante 20 minutos, y después se

lavan con agua corriente durante 1 minuto. A continuación, se diferencian en alcohol ácido (1% ácido Clorhídrico en alcohol al 70%) durante 10 segundos. Se lava en agua corriente durante 5 minutos. Se tiñe entonces con el reactivo rojo (Briebrich scarlet, fucsina ácida y ácido acético glacial) durante 15 minutos, y se aclara con agua destilada. Se trata con ácido fosfotungsténico al 5% durante 15 minutos y se aclara brevemente en agua destilada. Se elimina el exceso de agua y se observa la preparación para asegurarse de que la tinción es adecuada. Se introduce en la tinción verde durante 1 minuto y se aclara con agua destilada. Después, se trata con ácido acético al 1% durante 3 minutos, y se aclara con agua destilada. Se elimina el exceso de agua y se comprueba que la tinción es adecuada. Para finalizar, se deshidrata en alcoholes de gradación creciente y se monta.

2.J.5. Estudio histomorfométrico de fibrosis en el parénquima hepático con tinción de rojo sirio

Para valorar el grado de fibrosis en el hígado se utilizó un sistema de análisis de imagen que cuantifica el colágeno del mismo midiendo en secciones histológicas el área teñida con Rojo Sirio. Las imágenes microscópicas se captaron con una cámara Leica DC 300 acoplada a un microscopio Leica DM 5000B con pletina motorizada. Se digitalizó un área mínima de 15 mm² de tejido mediante la captación secuencial y automática de imágenes microscópicas obtenidas con el objetivo 10x. Para cuantificar el área teñida por el Rojo Sirio respecto al área total del tejido hepático se utilizó el software Leica Qwin. En ésta aplicación informática se desarrolló un procedimiento o rutina que incluyó la segmentación de cada una de las imágenes con el fin de obtener el área teñida por Rojo Sirio en valores numéricos. Así, comparando el valor numérico del área teñida con Rojo Sirio respecto al valor numérico del área total analizada se obtiene el porcentaje de área del hígado ocupada por fibrosis.

2.K. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la aplicación informática SPSS versión: 15.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo de los resultados obtenidos, expresándolos mediante una medida de centralización (media aritmética) y una medida de dispersión (desviación estándar) ($\bar{x} \pm DE$).

La comparación entre variables cualitativas y cuantitativas se ha realizado mediante la función Chi Cuadrado, estableciendo la significación estadística en función de los residuos corregidos, considerándose un resultado significativo cuando dicho residuo no está incluido en el intervalo [+2, -2].

Para comparar las variables cuantitativas se utilizó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA). En éste último caso, cuando existía un contraste estadísticamente significativo se empleó el test de Duncan para contrastes a posteriori. Previamente, se había comprobado que las variables estudiadas se ajustaban a una distribución Normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. SUPERVIVENCIA Y COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS

1.A. Supervivencia

De todos los animales que formaron parte del diseño experimental sobrevivieron 118, 50 de los cuales fueron pseudo-operados (PSO) y 68 con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ). Los animales con CMQ presentaban ictericia y coluria intensas, así como acolia moderada.

1.B. Complicaciones postoperatorias

Las ratas pseudooperadas no presentaron complicaciones durante la evolución postoperatoria (p.o.). Por el contrario, las ratas con CM sufrieron las siguientes alteraciones:

Pared abdominal:

En los animales colestásicos la cicatriz de la laparotomía mostraba evidentes alteraciones tróficas e, incluso en 8 casos (11,76%) se desarrollaron eventraciones.

Complicaciones neurológicas:

A las 8-9 semanas del p.o. los animales colestásicos se muestran menos reactivos y disminuye su movilidad, siendo además, sus movimientos más lentos respecto a las ratas pseudooperadas y disminuye su respuesta a los estímulos dolorosos.

Síntomas colestásicos:

Los animales con CM presentaban ictericia cutánea, más evidente en las orejas, las extremidades y la cola, coluria y acolia.

1.C. Hallazgos macroscópicos en la necropsia

Pared abdominal:

La observación macroscópica de la pared abdominal cuando se sacrifican los animales, a las 8-9 semanas del p.o., demuestra un significativo déficit de la cicatrización, con atrofia de la capa muscular y, en 8 casos (11,76%) eventración.

Complicaciones hemorrágicas:

Al realizar la laparotomía en el momento del sacrificio, en las ratas con CM se produce mayor hemorragia respecto de las ratas pseudooperadas.

Además, 16 (23,53%) ratas colestásicas presentan hematomas intramusculares en los puntos de punción para la administración de la profilaxis anti-hemorrágica y antibiótica en las extremidades inferiores.

Afectación hepática:

En las ratas con CM existe una heterogeneidad de la afectación hepática. Algunos animales (n=12; 17,65%) presentan aumento intenso de la consistencia hepática y hepatomegalia franca, asociado a un gran volumen de ascitis, e intensa ictericia muco-cutanea, en tanto que el resto (n=56; 82,35%) desarrollan hígados congestivos o esteatósicos sin tanto aumento de la consistencia hepática ni signos marcados de hipertensión portal. Un mínimo porcentaje de ratas (n=3; 4,41%) desarrollan pequeños quistes biliares a nivel hiliar previos a la ligadura de los conductos biliares de drenaje de cada lóbulo hepático. En ocasiones (n=48; 70,59%) se aprecian adherencias epiploicas al hígado con circulación colateral porto-hepática. A su vez, en las ratas colestásicas que recibieron tratamiento con ketotifén a partir de la sexta semana del p.o. la presencia de ascitis es mínima y el hígado tiene un aspecto congestivo, pero sin aumento de su consistencia y ocasionalmente presentan algún foco de necrosis.

Sistema gastro-intestinal:

Algunas ratas (n=27; 39,71%) desarrollan úlceras gástricas. El estómago e intestino delgado aparece ocasionalmente con paredes engrosadas y edematosas. También se observa ocasionalmente edema retroperitoneal y pancreático. Es frecuente encontrar circulación colateral portosistémica, vasculopatía venosa mesentérica y adenitis mesentérica hemorrágica. En las ratas colestásicas tratadas con ketotifén se produce una marcada atrofia de la grasa mesentérica.

Tórax:

A nivel torácico se ha comprobado la existencia de edema pulmonar y derrame pleuro-pericárdico en algunas (n=12; 17,65%).

Sistema Génito-Urinario:

Los testículos de las ratas con colestasis se muestran disminuidos de tamaño, edematosos y con tinte icterico. Los riñones presentan mayor tamaño y desarrollan un color verde oscuro.

2. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

Los resultados correspondientes al peso corporal (PC) de los animales, tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento de peso corporal, se representan en la tabla 1 y en las figuras 29, 20 y 31. El incremento del peso corporal al final del período evolutivo es menor ($p<0.001$) en las ratas con colestasis (CMQ), tanto a las seis como a las 8-9 semanas de evolución p.o. respecto de sus correspondientes ratas pseudooperadas (PSO). (Tabla 1; figura 31). La administración de ketotifén a los animales PSO apenas produce variaciones en su aumento de peso al final del período p.o. de 8-9 semanas, en tanto que en las ratas colestásicas ketotifén causa un incremento ($p<0.01$) de PC respecto de las ratas con colestasis que no fueron tratadas con éste fármaco. (Tabla 1; figura 31).

Tabla 1. Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g), e incremento de peso corporal (Δ PC; g) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	PCI (g)	PCF (g)	Δ PC (g)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	242,41 ^{•••} ± 15,49	394,1 ^{††} ± 26,29	151,75 ^{•••†††***βββ} ± 35,24
	CMQ-9 (n = 20)	296,31 ± 46,85	346,20 ^{††ΦΣ} ± 33,89	49,90 ^{**βββ} ± 40,54
Serie II	PSO-6 (n = 20)	256,15 ^{•••} ± 16,53	366,45 ^{†ΦΣ} ± 27,12	110,30 ^{•••†††} ± 21,89
	CMQ-6 (n = 20)	251,73 ^{•••} ± 27,96	283,00 ^{ΦΣ} ± 36,03	31,28 ^{***βββ} ± 31,73
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	247,53 ^{•••} ± 26,01	408,53 [†] ± 37,11	161,00 ^{•••†††***βββ} ± 39,28
	CMQ-KTF (n = 14)	256,15 ^{•••} ± 31,48	343,23 ^{††ΦΣ} ± 29,94	87,08 ^{••††} ± 37,05

Media ± desviación estándar. βββ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; •• $p < 0.01$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; ; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

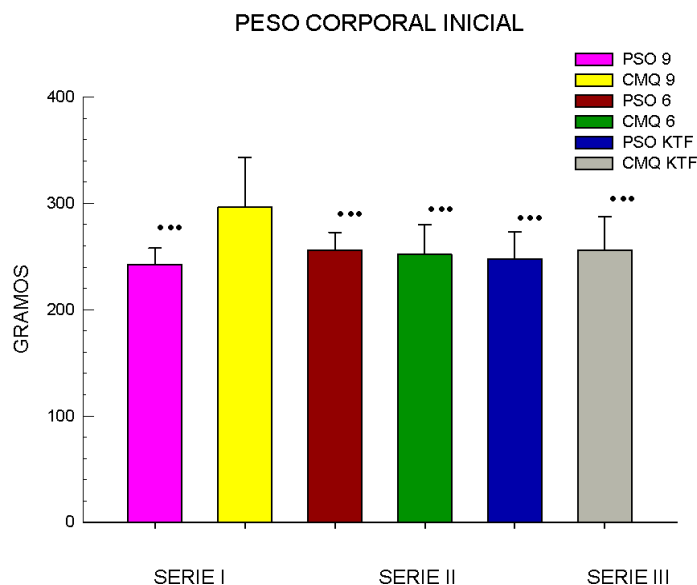


Figura 29: Peso corporal inicial en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Peso corporal inicial (PCI;g), en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ). Media \pm desviación estándar. *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

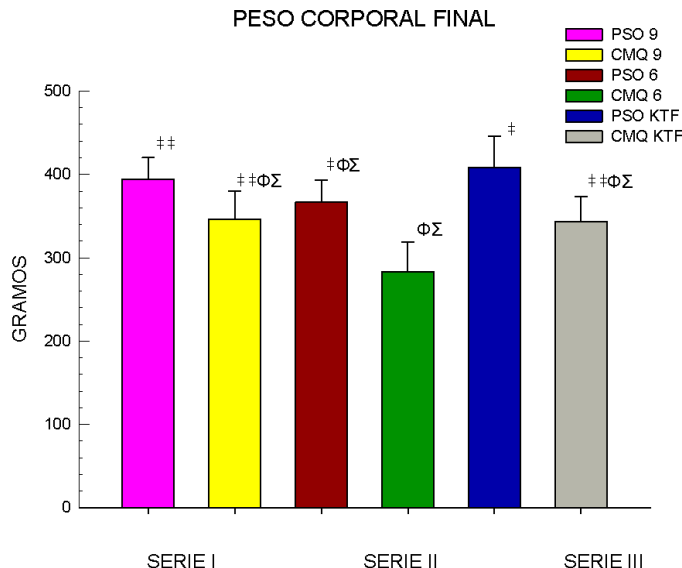


Figura 30: Peso corporal final en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-6.

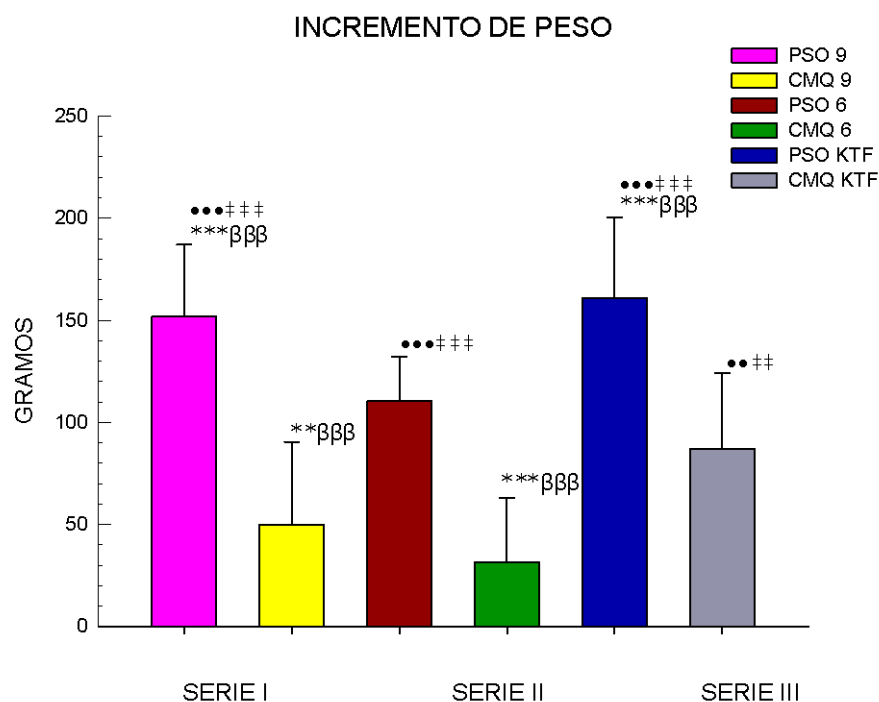


Figura 31. Incremento de peso corporal (ΔPC ; g) en la Serie I, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la Serie II, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la serie III, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\#\#$ $p < 0.01$; $\#\#\#$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $\ast\ast$ $p < 0.01$; $\ast\ast\ast$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

3. PESO HEPATICO

Los animales con colestasis a las 8-9 semanas del p.o., tanto los que no fueron tratados con ketotifén como los que recibieron ketotifén desde la sexta semana del p.o. hasta su sacrificio, presentaban hepatomegalia ($p < 0.001$) respecto a los animales pseudooperados (tabla 2; figura 32). Por el contrario a las 6 semanas de evolución, el peso hepático (PH) es similar en las ratas con colestasis respecto de los PSO (tabla 2; figura 32). El PH en las ratas colestásicas de larga evolución (8-9 semanas del p.o) es superior ($p < 0.001$) respecto de las ratas con colestasis a las 6 semanas de evolución (tabla 2; figura 32). La administración de ketotifén parece no ejercer efectos sobre el PH ni en los animales PSO, ni en los colestásicos (tabla 2; figura 32).

Cuando analizamos la relación PH/PC los resultados son similares, salvo por el hecho de que a las 6 semanas del postoperatorio se produce un incremento de PH/PC ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis respecto de las pseudo-operadas (tabla 2; figura 33).

Tabla 2. Peso hepático (PH;g), Relación peso hepático / peso corporal x 100 (PH/PC; %) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ).

Serie	Grupo	PH (g)	PH/PC (%)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	13,83 ^{●●●***} ± 2,27	3,53 ^{+++●●●***} ± 0,57
	CMQ-9 (n = 20)	26,02 ± 5,23	7,59 ⁺⁺⁺ ± 1,86
Serie II	PSO-6 (n = 20)	11,55 ^{●●●***} ± 1,48	3,15 ^{+++●●●***} ± 0,35
	CMQ-6 (n = 20)	13,99 ^{●●●***} ± 2,85	4,94 ^{●●●***} ± 0,81
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	13,41 ^{●●●***} ± 1,37	3,29 ^{+++●●●***} ± 0,22
	CMQ-KTF (n = 14)	28,22 ± 5,23	8,23 ⁺⁺⁺ ± 1,42

Media ± desviación estándar. +++ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF

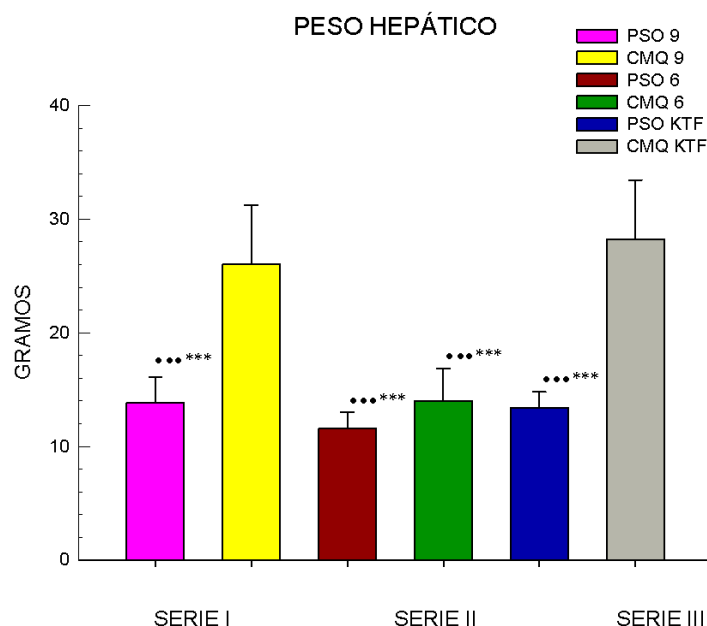


Figura 32: Peso hepático (PH;g) en la Serie I, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la Serie II, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la serie III, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

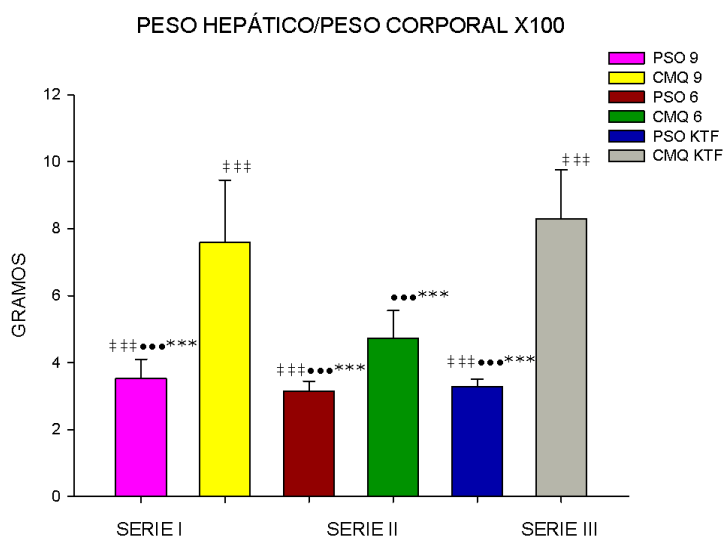


Figura 33: Relación peso hepático / peso corporal x 100 (PH/PC; %) en la Serie I, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la Serie II, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la serie III, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ). Media \pm desviación estándar. ### $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

En lo referente al peso de los lóbulos hepáticos, la distribución del peso de los lóbulos anteriores (medio y lateral izquierdo) y de los lóbulos posteriores (lateral derecho y caudado) sigue la misma pauta. Así, el peso lobular hepático aumenta ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis, con o sin ketotifén, respecto de las pseudooperadas, pero sólo a las 8-9 semanas del p.o. (tabla 3; figuras 34 y 35). Además, el peso de los lóbulos hepáticos anteriores y posteriores en las ratas con colestasis a las 8-9 semanas de evolución es superior ($p < 0.001$) respecto al registrado a las 6 semanas del p.o. (tabla 3; figuras 34 y 35).

Tabla 3. Peso de los lóbulos hepáticos anteriores (PLLAA;g) y de los lóbulos hepáticos posteriores (PLLPP; g) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	PLLAA (g)	PLLPP (g)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	8,27 ^{***●●●} ± 0,92	4,43 ^{***●●●} ± 0,79
	CMQ-9 (n = 20)	15,61 ± 3,68	10,04 ± 2,6
Serie II	PSO-6 (n = 20)	7,85 ^{***●●●} ± 0,99	3,7 ^{***●●●} ± 0,87
	CMQ-6 (n = 20)	10,48 ^{***●●●} ± 2,51	3,51 ^{***●●●} ± 1,18
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	8,83 ^{***●●●} ± 0,9	4,57 ^{***●●●} ± 0,69
	CMQ-KTF (n = 14)	17,21 ± 3,45	11,02 ± 2,66

Media ± desviación estándar. ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9;
*** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

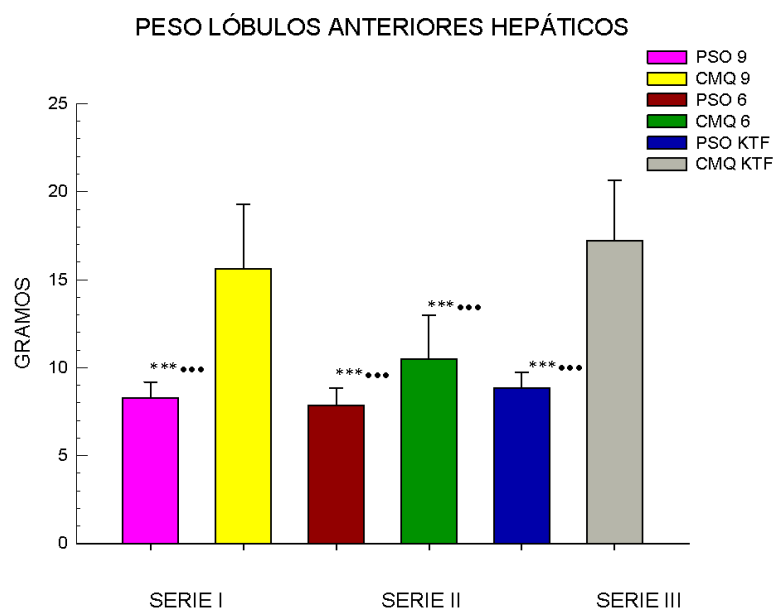


Figura 34: Peso de los lóbulos hepáticos anteriores (PLLAA;g) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

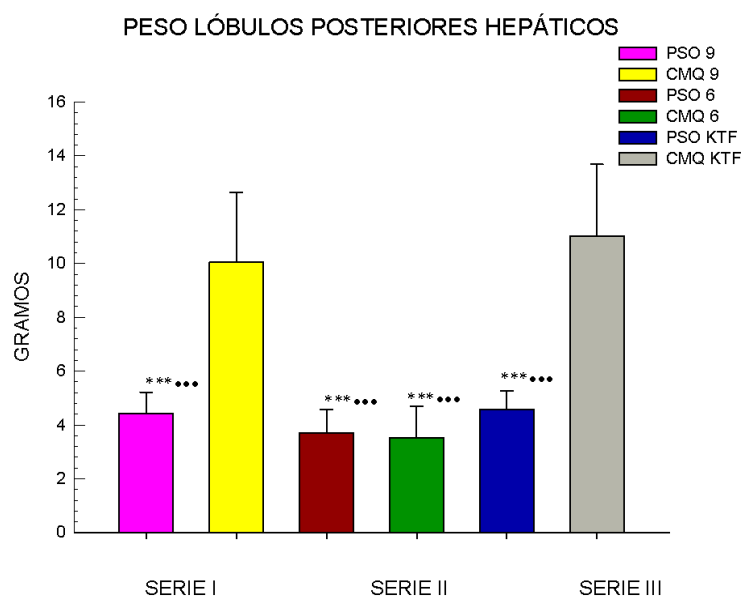


Figura 35: Peso de los lóbulos hepáticos posteriores (PLLPP; g) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

Cuando se consideran el peso de los lóbulos hepáticos anteriores (medio y lateral izquierdo) y posteriores (lateral derecho y caudado) respecto del peso corporal, el índice del peso de los lóbulos anteriores respecto del peso corporal es mayor ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis a las 6 semanas respecto de las ratas colestásicas a las 9 semanas de evolución (tabla 4; figura 36). Además, en éste período del p.o. este índice es también mayor ($p < 0.01$) en las ratas con colestasis respecto de las ratas pseudo-operadas. Tras 8-9 semanas de evolución la administración de ketotifén aumenta ($p < 0.05$) el índice peso LLAA/PC en los animales pseudo-operados, en tanto que lo disminuye ($p < 0.01$) en las ratas colestásicas (tabla 4; figura 36). Por el contrario, la relación de los LLPP/PC es menor ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis a las 6 semanas respecto de las ratas colestásicas a las 9 semanas de evolución (tabla 4; figura 37). Además, en éste período del p.o. este índice es también menor ($p < 0.01$) en las ratas con colestasis respecto de las ratas pseudo-operadas. Tras 8-9 semanas de evolución la administración de ketotifén aumenta ($p < 0.05$) el índice peso LLPP/PC en las ratas colestásicas (tabla 4; figura 37).

Tabla 4. Relación peso lóbulos hepáticos anteriores / peso hepático x 100 (PLHA/PH; %), Relación peso lóbulos hepáticos posteriores / peso hepático x 100 (PLHP/PH; %) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	PLLA/PH (%)	PLLPP/PH (%)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	60,58 ⁺⁺⁺ ± 6,92	32,63 ^{++•*} ± 6
	CMQ-9 (n = 20)	60,1 ⁺⁺⁺ ± 8,45	38,86 ⁺⁺⁺ ± 8,08
Serie II	PSO-6 (n = 20)	68,15 ^{++••**ΦΦ} ± 5,03	31,85 ^{++••**} ± 5,03
	CMQ-6 (n = 20)	74,62 ^{•••***ΦΦΦ} ± 8,56	25,38 ^{•••**} ± 8,56
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	65,93 ^{+++••*Φ} ± 2,81	34,07 ^{+++•*} ± 2,81
	CMQ-KTF (n = 14)	61,08 ⁺⁺⁺ ± 5,57	38,92 ⁺⁺⁺ ± 5,57

Media ± desviación estándar. Φ $p < 0.05$; ΦΦ $p < 0.01$; ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; • $p < 0.05$; •• $p < 0.01$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

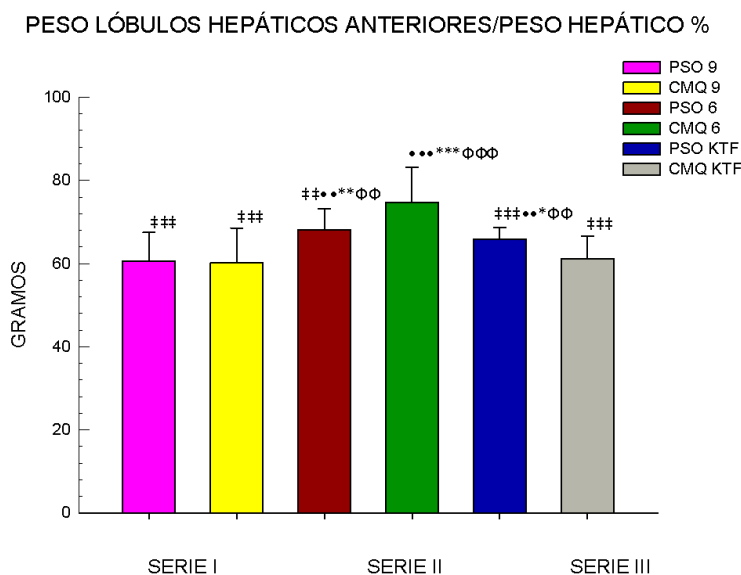


Figura 36: Relación peso lóbulos hepáticos anteriores / peso hepático $\times 100$ (PLHA/PH; %), en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con Ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ΦΦ $p < 0.01$; ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; •• $p < 0.01$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

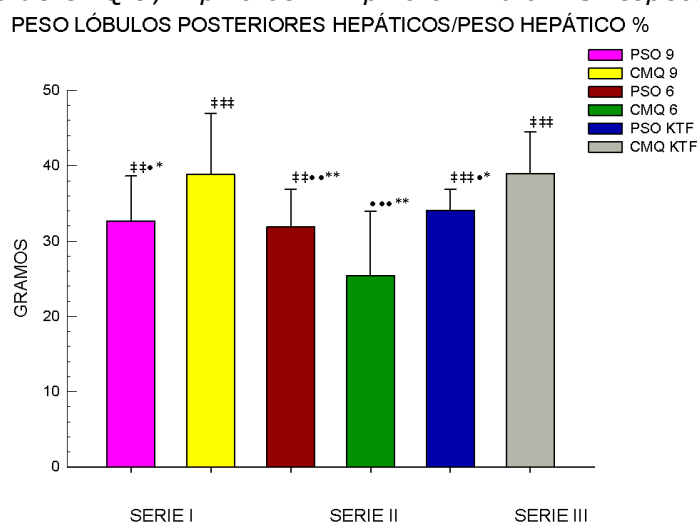


Figura 37: Relación peso lóbulos hepáticos posteriores / peso hepático $\times 100$ (PLHP/PH; %) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con Ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; • $p < 0.05$; •• $p < 0.01$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

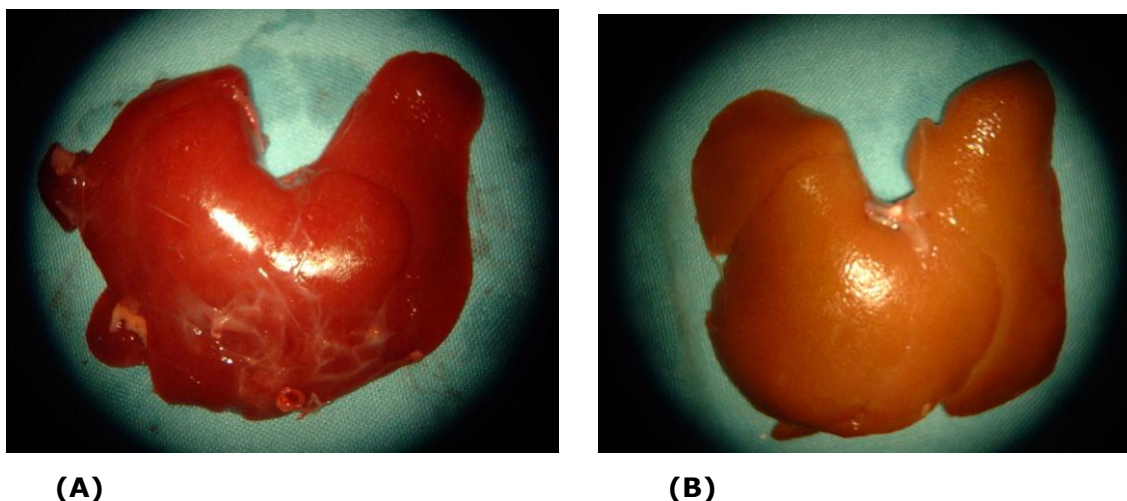


Figura 38. Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado en una rata del grupo de pseudo-operadas (A), y otra del grupo con colestasis (B). Se aprecia hepatomegalia, ictericia y aspecto granulado en el hígado colestásico.

4. PESO ESPLÉNICO

Todos los animales con colestasis, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas de evolución p.o., mostraron esplenomegalia, siendo el aumento del peso esplénico (PE) y del índice peso esplénico/peso corporal (PE/PC) significativo ($p < 0.001$) respecto de las ratas pseudooperadas (tabla 5; figura 39). En las ratas con colestasis el índice PE/PC es superior ($p < 0.001$) a las 6 semanas respecto de las ratas que se estudiaron a las 8-9 semanas del p.o. La administración de ketotifén no reduce la esplenomegalia en las ratas con colestasis, aunque si hay una menor ($p < 0.05$) relación PE/PC en las ratas con colestasis a las que se administra ketotifén (CMQ-KTF) al compararlas con las pseudooperadas (tabla 5; figura 40).

Tabla 5. Peso esplénico (PE;g) y Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	PE (g)	PE/PC (%)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	0,78 ^{+++●●●***}	0,20 ^{*****●●●}
		± 0,95	± 0,02
	CMQ-9 (n = 20)	2,04	0,59 ^{***}
		± 0,41	± 0,11
Serie II	PSO-6 (n = 20)	0,93 ^{+++●●●***}	0,25 ^{*****●●●}
		± 0,14	± 0,03
	CMQ-6 (n = 20)	2,02	0,71 ^{●●●}
		± 0,52	± 0,13
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	0,84 ^{+++●●●***}	0,21 ^{*****●●●}
		± 0,15	± 0,03
	CMQ-KTF (n = 14)	2,11	0,62 ^{††}
		± 0,32	± 0,12

Media ± desviación estándar. †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

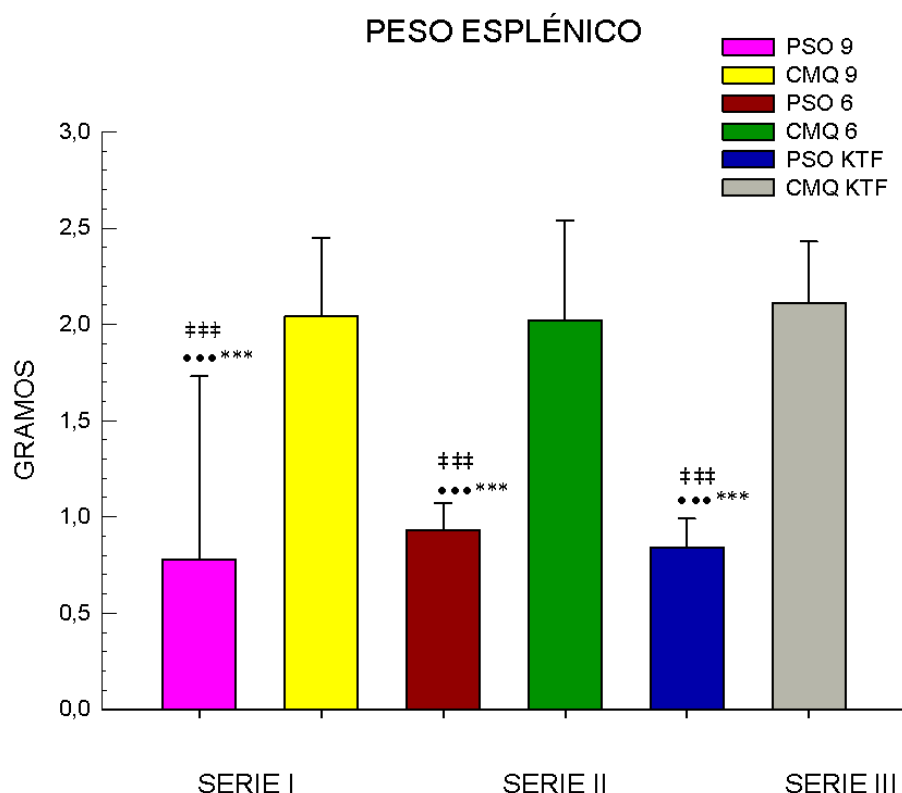


Figura 39: Peso esplénico (PE;g) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Peso esplénico (PE;g) en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ). Media \pm desviación estándar. ### $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF

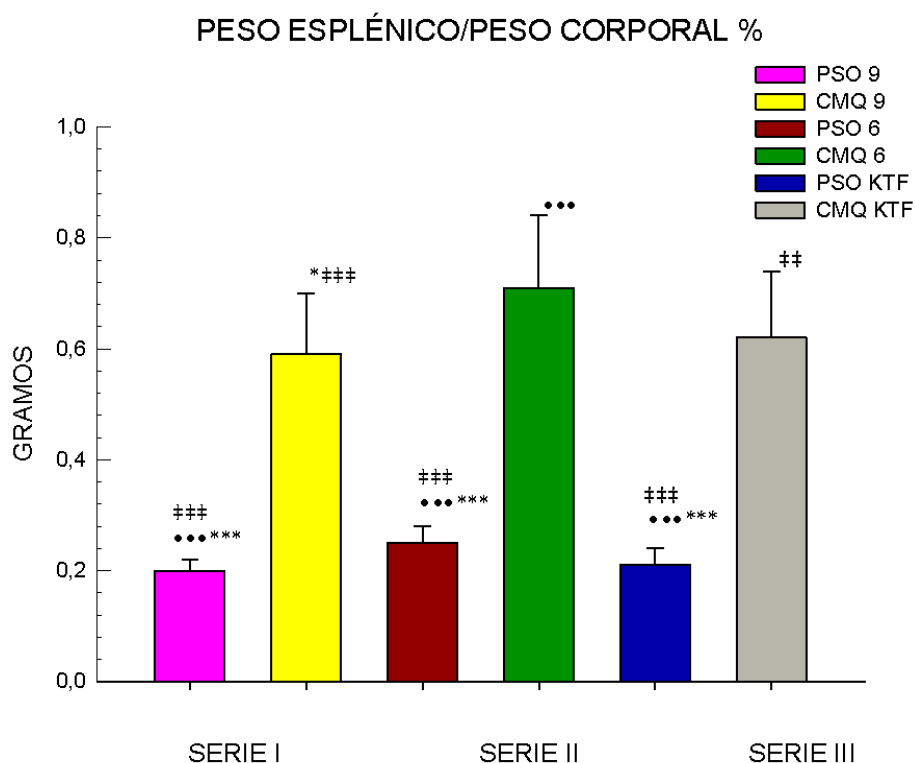


Figura 40: Relación peso esplénico/peso corporal x 100 (PE/PC; %) Peso esplénico (PE;g) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) en ratas pseudo-operadas (PSO), y con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ). Media \pm desviación estándar. ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

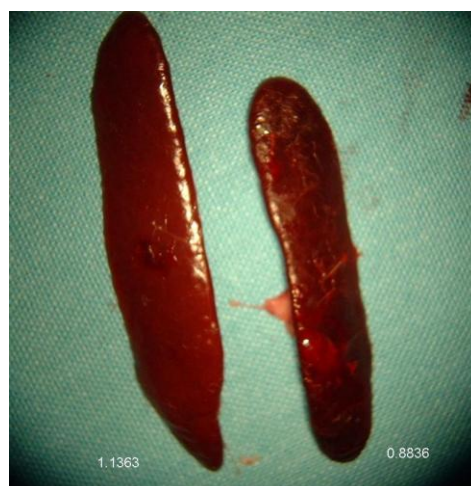


Figura 41. Fotografía comparativa del tamaño de un bazo de una rata con CMQ (peso de 1,13 g) y de otra pseudo-operada (peso 0,88g).

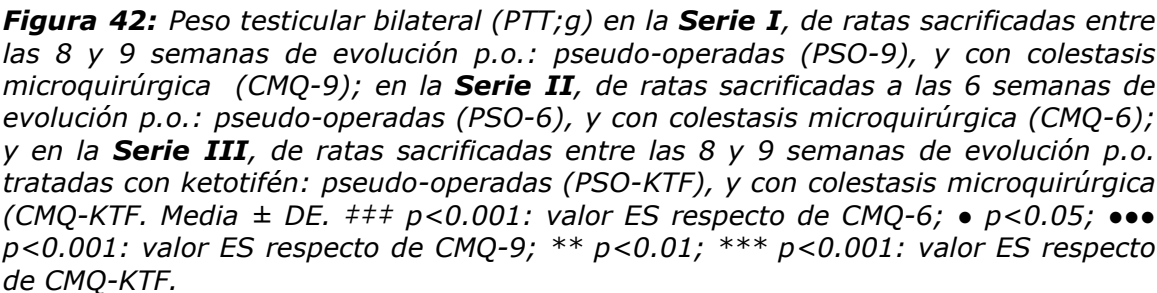
5. PESO TESTICULAR

En las ratas con colestasis, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas de evolución p.o., se produce atrofia testicular, siendo el peso testicular inferior ($p<0.001$) en éstos animales respecto de los animales pseudooperados (tabla 6; figura 51). El PTT es inferior ($p<0.001$) a las 6 semanas de colestasis respecto a la evolución más prolongada (8-9 semanas) (tabla 6; figura 51). La administración de ketotifén a las ratas con colestasis (CMQ-KTF) no ejerce ningún efecto sobre el peso testicular (tabla 6; figura 51). Sin embargo, cuando el peso testicular se considera respecto del peso corporal, la atrofia testicular es menor ($p<0.05$) en las ratas con colestasis y, además ketotifén parece ejercer un efecto trófico ya que el peso testicular en las ratas con colestasis es similar al de las ratas pseudo-operadas (tabla 6; figura 52).

Tabla 6. Peso testicular bilateral (PTT;g), Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PTT/PC; %) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	PTT (g)	PTT/PC (%)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	3,64 ^{+++●●**} ± 0,29	0,91 ^{+++●β} ± 0,65
	CMQ-9 (n = 20)	2,90 ⁺⁺⁺ ± 0,56	0,85 ^{++ββ} ± 0,17
Serie II	PSO-6 (n = 20)	3,65 ^{+++●●**} ± 0,32	0,96 ^{+++●●} ± 0,77
	CMQ-6 (n = 20)	2,08 ^{●●●***} ± 0,70	0,72 ^{βββ●●} ± 0,18
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	3,78 ^{+++●●●***} ± 0,37	0,93 ^{+++●β} ± 0,11
	CMQ-KTF (n = 14)	3,10 ⁺⁺⁺ ± 0,40	0,91 ^{+++●} ± 0,10

Media ± desviación estándar. β p<0.05; ββ p<0.01; βββ p<0.001: valor ES respecto de PSO-6; ++ p<0.01; +++ p<0.001: valor ES respecto de CMQ-6; ● p<0.05; ●● p<0.01; ●●● p<0.001: valor ES respecto de CMQ-9; ** p<0.01; *** p<0.001: valor ES respecto de CMQ-KTF.



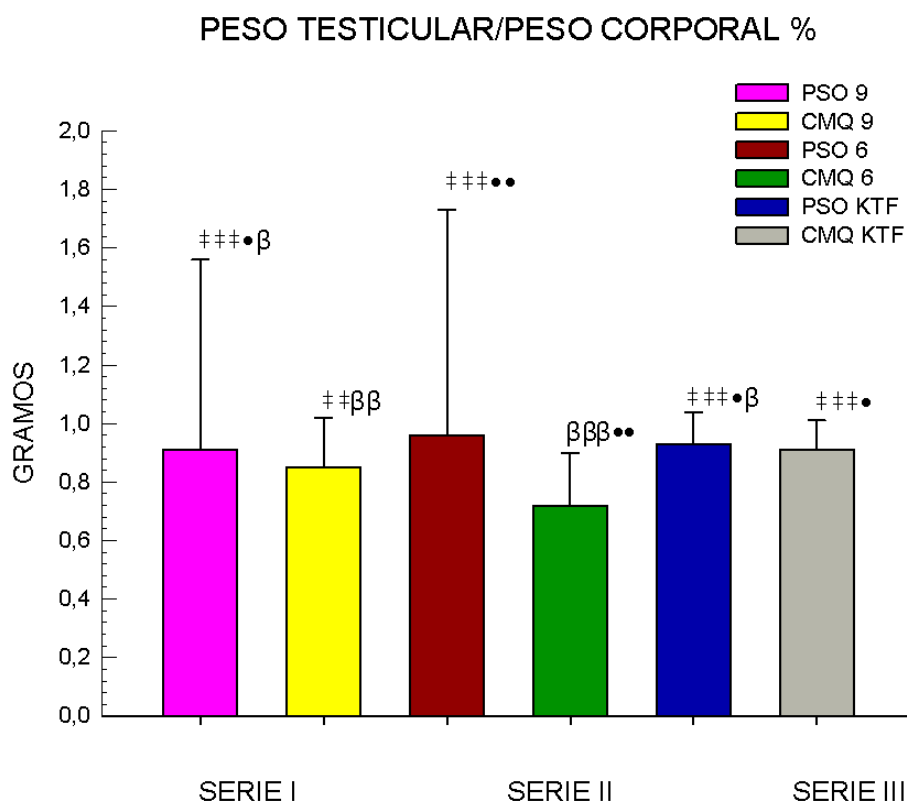


Figura 43: Relación peso testicular / peso corporal $\times 100$ (PTT/PC; %) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; • $p < 0.05$; •• $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9.

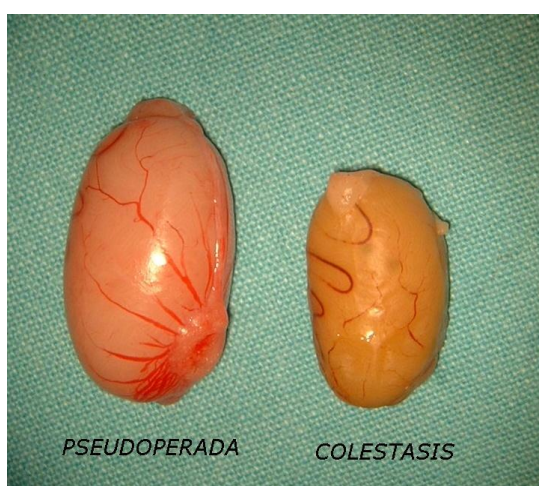


Figura 44. Imagen demostrativa de la atrofia testicular que se produce en las ratas con colestasis (derecha) respecto de las ratas pseudo-operadas (izquierda).

6. PRESIÓN PORTAL

La presión portal aumenta en las ratas con colestasis con respecto a las pseudooperadas ($p < 0,001$), sin existir diferencias cuando se tratan con ketotifén (tabla 7; figura 45).

Tabla 7: Presión Portal (PP; mm Hg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	PP (mm Hg)
Serie I	PSO-9 (n = 17)	6,73 ± 2,33
	CMQ-9 (n = 12)	13,43 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 2,34
Serie III	PSO-KTF (n=15)	7,02 ± 1,83
	CMQ-KTF (n = 14)	15,04 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 2,63

Media ± desviación estándar. ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

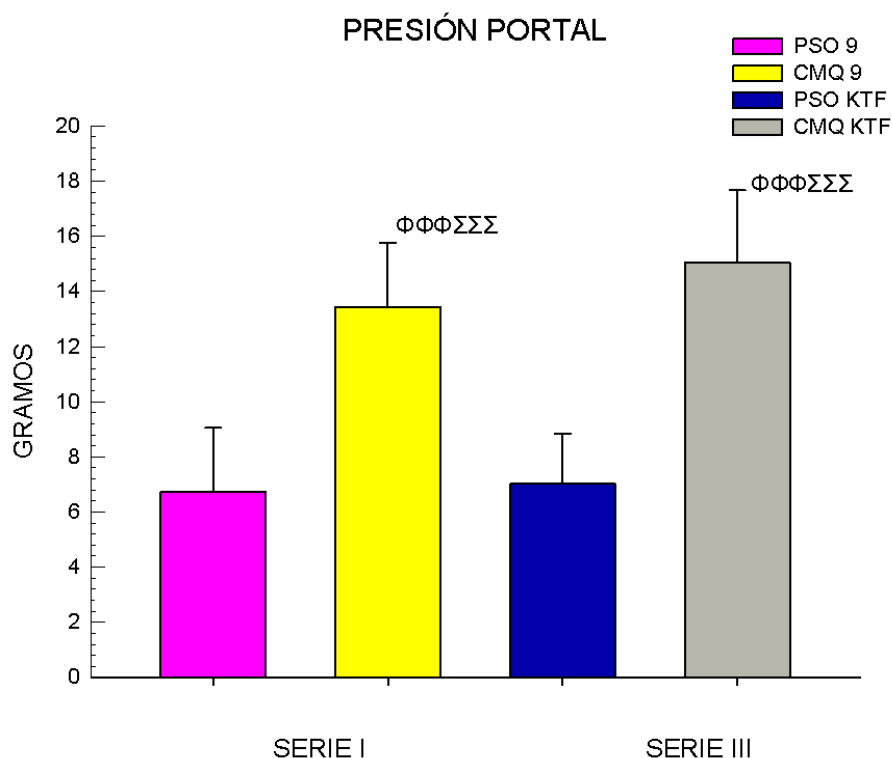


Figura 45: Presión Portal (PP; mm Hg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

7. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTOSISTÉMICA

El desarrollo de circulación colateral portosistémica se produce en todas las áreas anatómicas exploradas (paraesofágica, esplenorrenal y pararrectal), y prácticamente en la totalidad de los animales con CMQ (figuras 46, 47 y 48). Existe mayor presencia de circulación colateral paraesofágica y pararrectal en las ratas con colestasis sacrificadas a las seis semanas del postoperatorio (CMQ-6), en particular (95% de circulación colateral paraesofágica presente respecto a un 81,1% esperado y un 100% de circulación colateral pararrectal presente respecto a un 86,8% esperado) respecto de las ratas colestásicas de 8-9 semanas de evolución (tabla 8; figuras 46, 48).

La administración de ketotifén a las ratas con colestasis produce una disminución del desarrollo de circulación colateral esplenorrenal y pararrectal, mientras que no tiene incidencia sobre la paraesofágica (76,9% de circulación colateral esplenorrenal presente respecto a un 94,3% esperado y un 84,6% de circulación colateral pararrectal presente respecto a un 86,8% esperado) (tabla 8; figuras 46, 47 y 48).

Tabla 8. Circulación colateral portosistémica, de tipos paraesofágica (PE), esplenorrenal (ER) y pararrectal (PR), en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.); -9); en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-6) de en la **Serie II** (sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.) y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén).

Serie	Grupo	PE		ER		PR	
		n	%	n	%	n	%
Serie I	CMQ-9 (n=20)	15	75 [*]	20	100	15	75 [*]
Serie II	CMQ-6 (n = 20)	19	95 [•]	20	100	20	100 [•]
Serie III	CMQ-KTF (n = 14)	9	69,2	10	76,9 [*]	11	84,6 [*]
Presencia esperada			81,1		94,3		86,8

*Existe una menor presencia de circulación colateral de la esperada.

•Existe una mayor presencia de circulación colateral de la esperada.

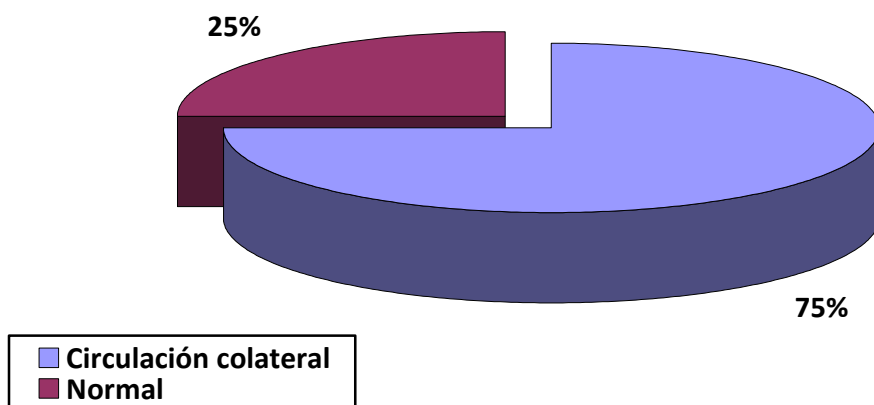
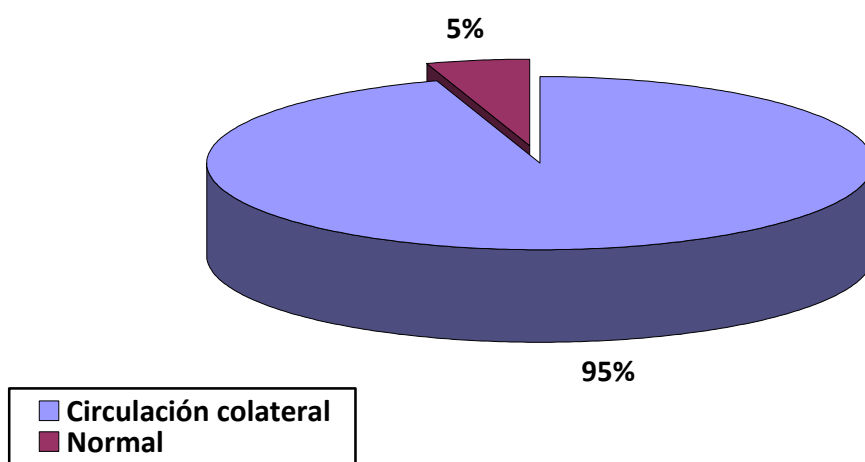
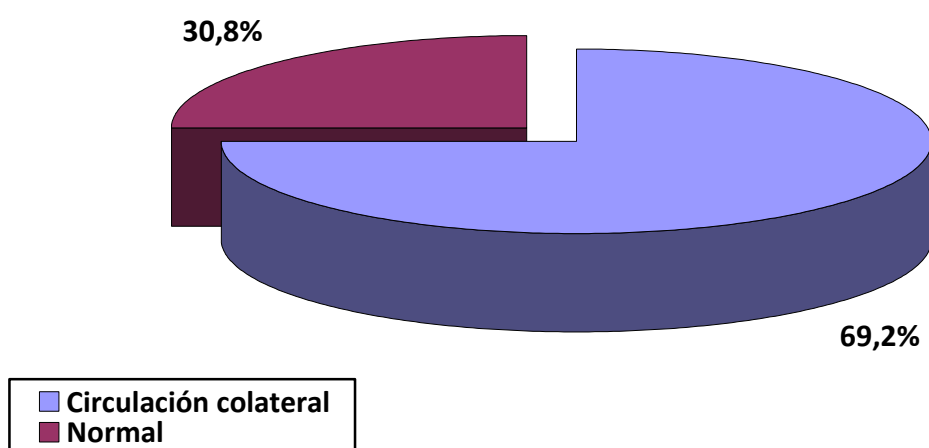
Circulación Colateral Paraesofágica. CMQ-9**Circulación Colateral Paraesofágica. CMQ-6****Circulación Colateral Paraesofágica. CMQ-KTF**

Figura 46: Circulación colateral portosistémica, te tipo paraesofágica (PE) en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ) a las 6 semanas de evolución p.o., a las 8-9 semanas de p.o. y a las 8-9 semanas de p.o. tratadas con ketotifén.

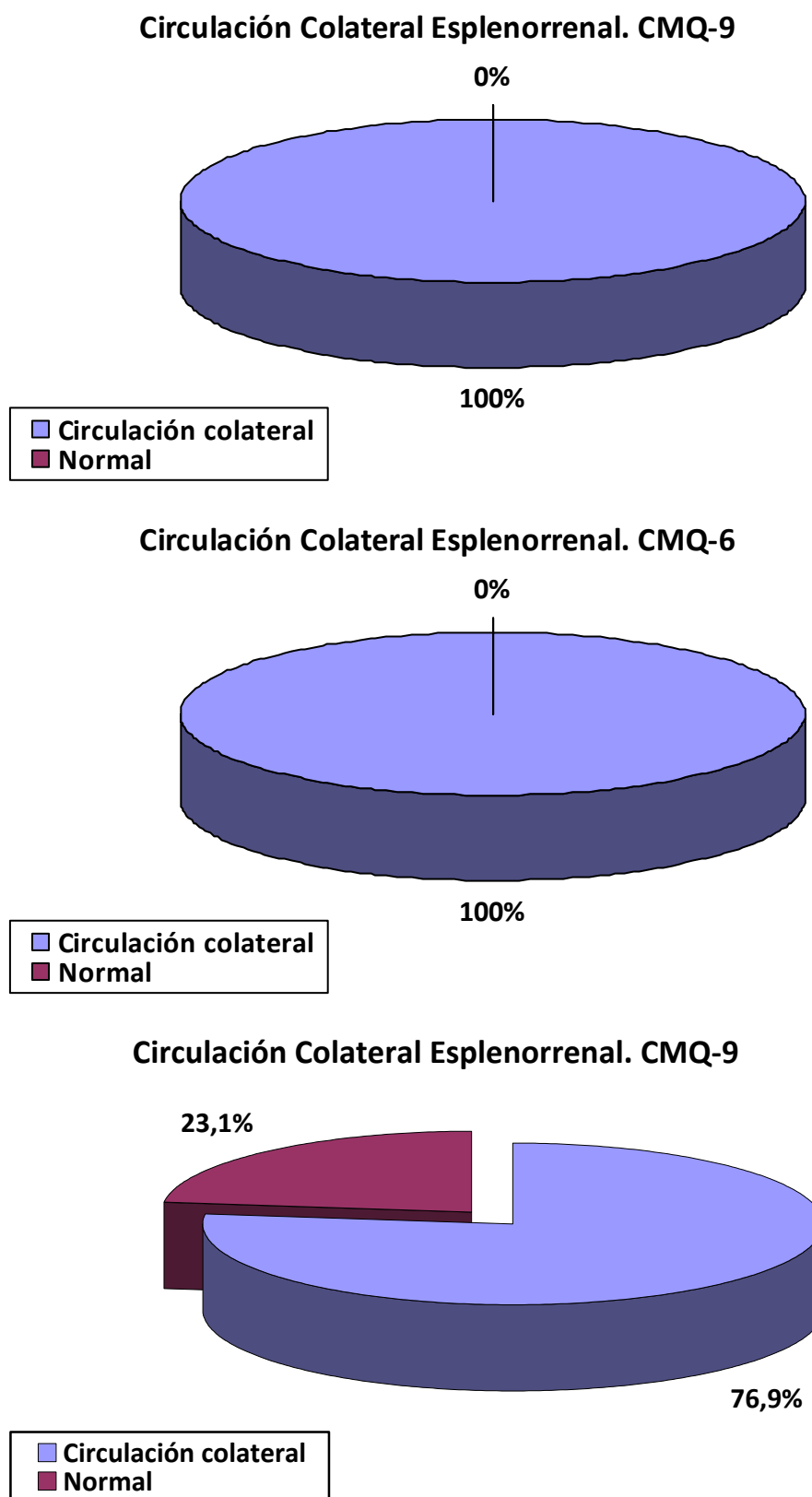


Figura 47: Circulación colateral portosistémica, de tipo esplenorrenal (ER) en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ) a las 6 semanas de evolución p.o., a las 8-9 semanas de p.o. y a las 8-9 semanas de p.o. tratadas con ketotifén.

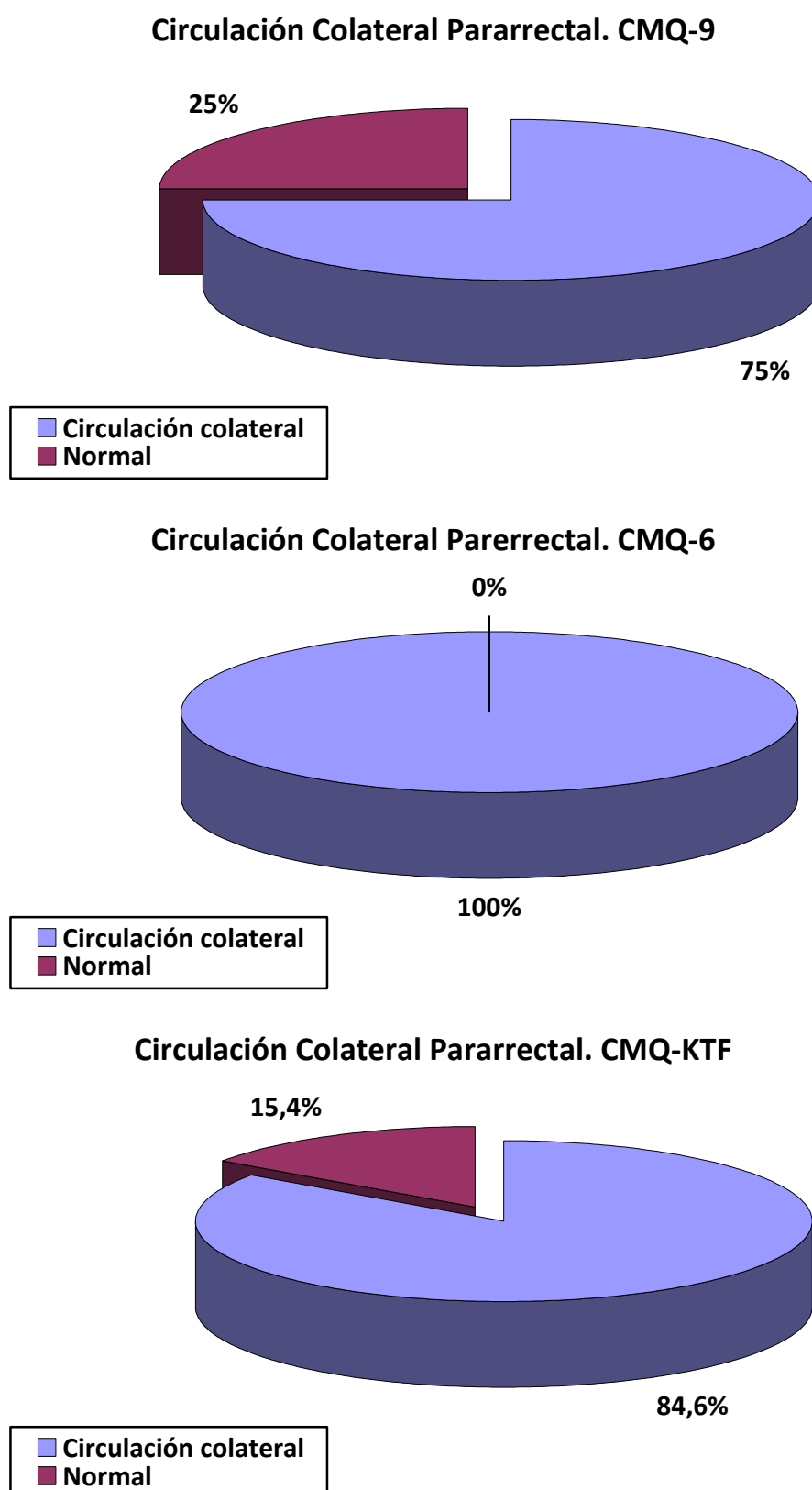


Figura 48: Circulación colateral portosistémica, de tipo pararrectal (PR) en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática (CMQ) a las 6 semanas de evolución p.o., a las 8-9 semanas de p.o. y a las 8-9 semanas de p.o. tratadas con ketotifén.

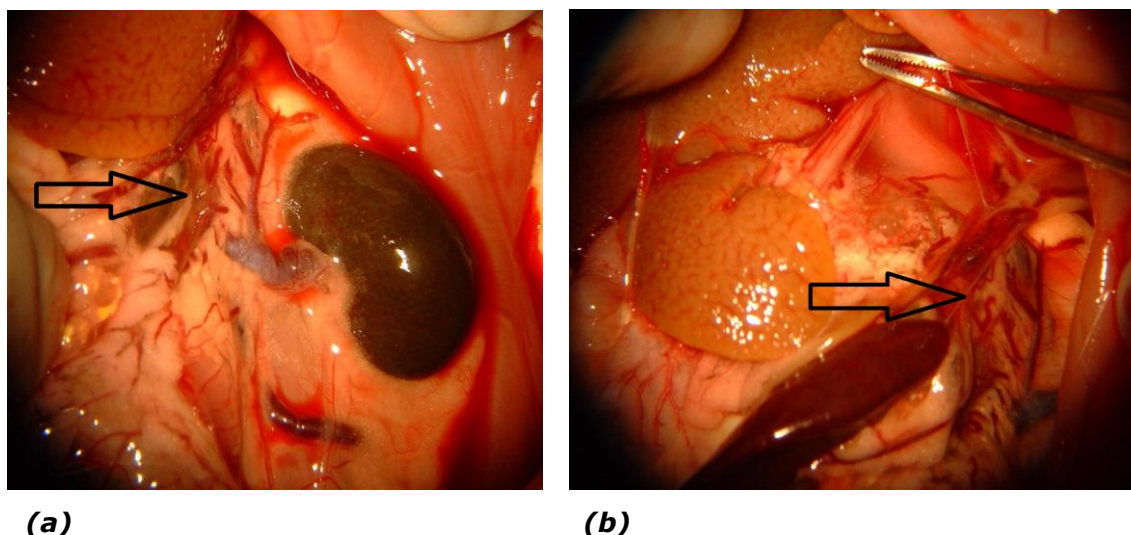


Figura 49. Imagen fotográfica en la que se observa la existencia de circulación colateral venosa **esplenorrenal (a)** y **paraesofágica (b)** en una rata con colestasis microquirúrgica extrahepática a las 6 semanas del postoperatorio.

8. VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA

La observación macroscópica de la circulación venosa mesentérica comprobó el desarrollo de dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Prácticamente todos los animales con colestasis presentaron vasculopatía venosa mesentérica (VVM), si bien las ratas sacrificadas a las 6 semanas del postoperatorio presentaron mayor VVM de grado I (80% frente a un 50,9% esperada) (tabla 9, figura 50). A medida que se alarga el período p.o. estudiado aumenta la gravedad de la VVM, así en tanto que a las 6 semanas de evolución sólo un 15% de las ratas colestásicas desarrollan VVM de grado II, su presencia aumenta hasta un 60% a las 8-9 semanas del p.o. (tabla 9; figura 50).

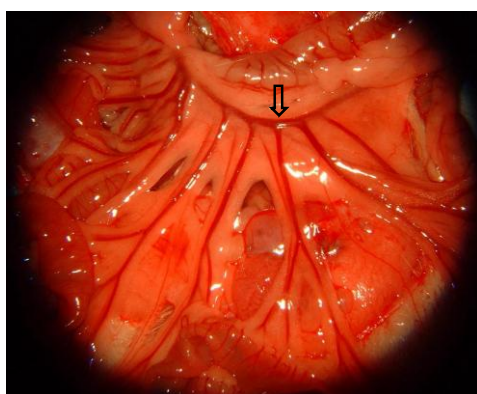
La administración de ketotifén no reduce la incidencia de VVM ni su gravedad en las ratas estudiadas a las 8-9 semanas de evolución. En éstos animales (CMQ-KTF) la ausencia de vasculopatía fue mayor de la esperada (7,7% frente a un 5,7% esperada) (tabla 9, figura 50)

Tabla 9. Vasculopatía venosa mesentérica de grado 0 (ausente), grado I (secundaria al clampaje de la vena mesentérica superior) y grado II (espontánea) en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.); -9); en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-6) de la **Serie II** (sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.) y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén).

Serie	Grupo	Grado 0		Grado I		Grado II	
		n	%	n	%	n	%
Serie I	CMQ-9 (n=20)	1	5 [*]	7	35	12	60
Serie II	CMQ-6 (n = 20)	1	5 [*]	16	80 [•]	3	15 [*]
Serie III	CMQ-KTF (n = 14)	1	7,7 [•]	4	30,8	8	61,5
Presencia esperada			5,7		50,9		43,4

*Existe una menor presencia de circulación colateral de la esperada.

•Existe una mayor presencia de circulación colateral de la esperada.



(a)



(b)

Figura 50. Vascularización venosa mesentérica:

(a) Rata pseudo-operada en la que se observa el aspecto macroscópico normal de la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas.

(b) Rata con CMQ en la que se aprecia vasculopatía de grado I, con dilatación y tortuosidad tras el clampaje la vena mesentérica superior.

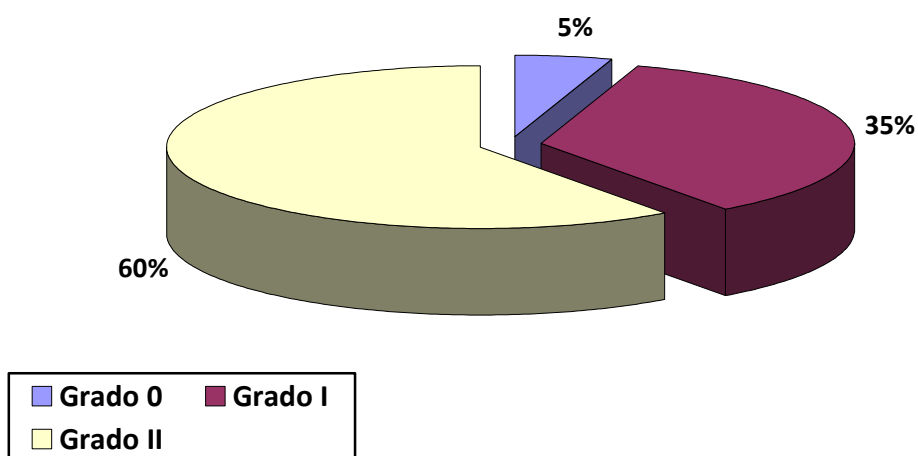
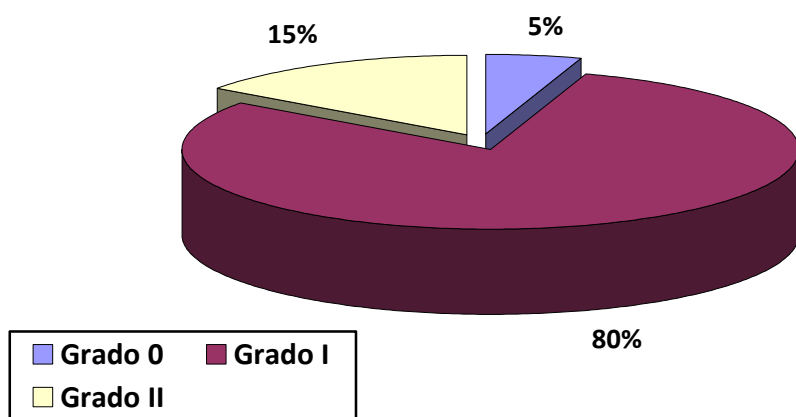
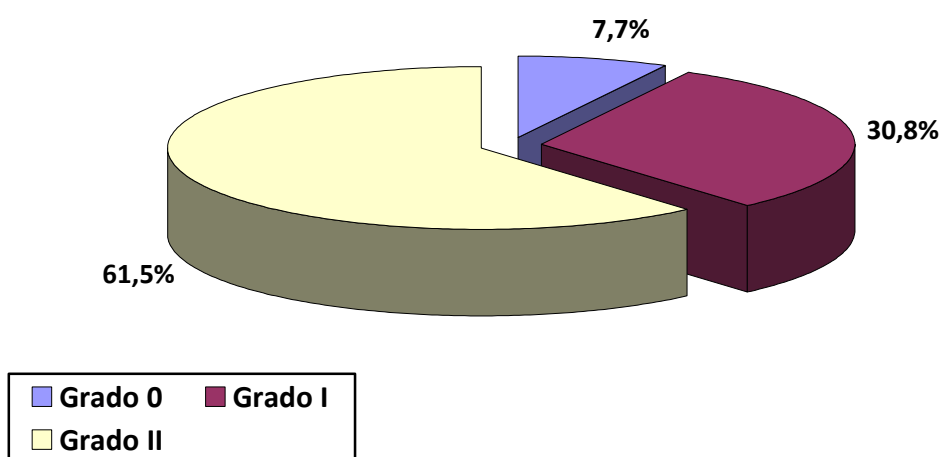
Vasculopatía Venosa Mesentérica. CMQ-9**Vasculopatía Venosa Mesentérica. CMQ-6****Vasculopatía Venosa Mesentérica. CMQ-KTF**

Figura 51: Desarrollo de Vasculopatía venosa mesentérica en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.); en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-6) de en la **Serie II** (sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.) y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén).

9. ASCITIS Y CONCENTRACIONES DE PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP) Y DE INTERLEUQUINA-13 (IL-13) EN EL LÍQUIDO ASCÍTICO

9.A. Presencia de ascitis

A seis semanas de evolución colestásica ninguna rata presentó ascitis. Sin embargo, ésta complicación ya es evidente a las 8-9 semanas de evolución, apreciándose una reducción significativa de la misma en los animales que han sido tratados con ketotifén (CMQ-KTF) respecto de los que no recibieron tratamiento con el fármaco (46.2% vs. 80%). En éste grupo de ratas (CMQ-KTF) se demostró la existencia de ascitis en un 46,2% de los sujetos frente a un 66,7% esperada (tabla 10, figura 52).

Tabla 10. Presencia de ascitis en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o) y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén).

Serie	Grupo	Ausencia de ascitis		Presencia de ascitis	
		n	%	n	%
Serie I	CMQ-9 (n=20)	4	20	16	80 [•]
Serie III	CMQ-KTF (n = 14)	7	53,8	6	46,2 [*]
Presencia esperada			33,3		66,7

^{*}Existe una menor presencia de ascitis de la esperada.

[•]Existe una mayor presencia de ascitis de la esperada.

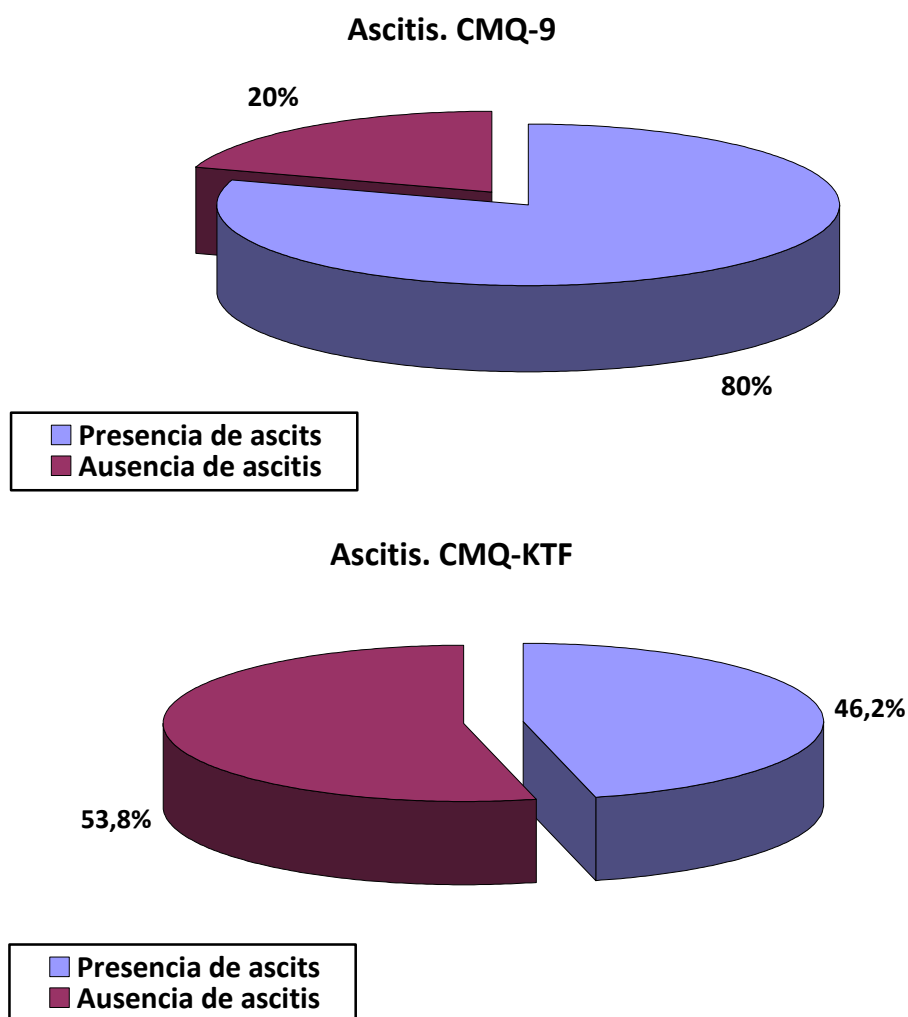


Figura 52: Presencia de ascitis en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén).

9.B. Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en el líquido ascítico

La administración de ketotifén induce una disminución ($p < 0,01$) de los niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina ("calcitonin gene-related peptide"; CGRP) en el líquido ascítico de las ratas con colestasis a las 8-9 semanas del p.o. (tabla 11; figura 53).

Tabla 11: Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina ("calcitonin gen-related peptide"; CGRP) en el líquido ascítico de ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén).

Serie	Grupo	CGRP (pg/mg prot)
Serie I	CMQ-9 (n = 5)	43,97 ± 3,81
	CMQ-KTF (n = 5)	13,67 ^{••} ± 1,22

Media ± desviación estándar. •• $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9.

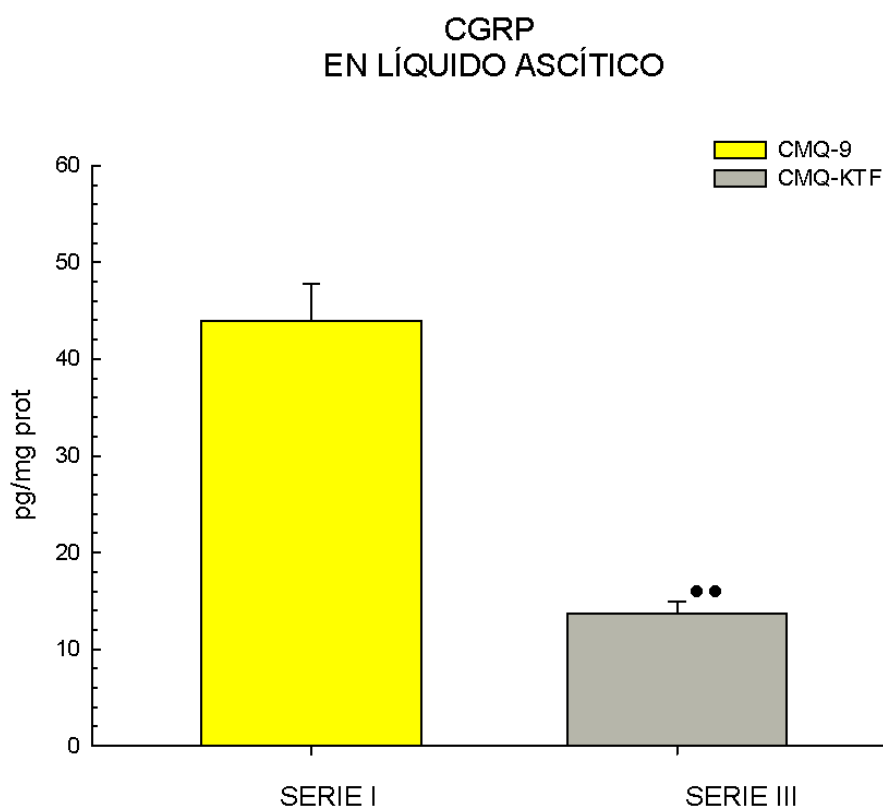


Figura 53: Niveles de péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en líquido ascítico de ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén). Media ± desviación estándar. •• $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9.

9.C. Niveles de interleuquina 13 (IL-13) en el líquido ascítico

Igualmente, la administración de ketotifén induce una disminución ($p < 0,01$) de los niveles de IL-13 en el líquido ascítico de las ratas con colestasis microquirúrgica (tabla 12; figura 54).

Tabla 12: Niveles de interleuquina 13 (IL-13) en el líquido ascítico de ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con Ketotifén).

Serie	Grupo	IL-13 (pg/mg prot)
Serie I	CMQ-9 (n = 5)	13,24 ± 0,97
	CMQ-KTF (n = 5)	2,24 ^{••} ± 1,22

Media ± desviación estándar. •• $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9.

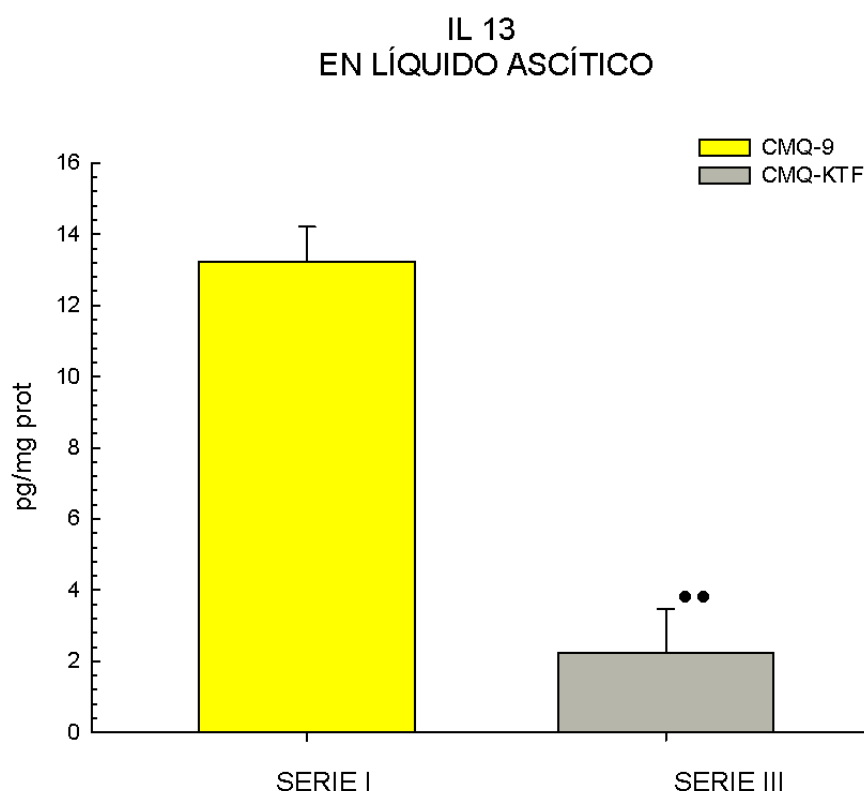


Figura 54: Niveles de interleuquina 13 (IL-13) en el líquido ascítico en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) de la **Serie I** (ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y en ratas con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF) de la **Serie III** (sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. y tratadas con ketotifén). Media ± DE; •• $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9.

10. DETERMINACIÓN SÉRICA DE MARCADORES DE FUNCIÓN HEPATO-BILIAR

Las concentraciones séricas de transaminasa glutámico oxalacética o aspartato aminotransferasa (AST), son superiores ($p < 0.001$) en todas las ratas colestásicas, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas del p.o. (tabla 13; figura 55). Asimismo, las concentraciones séricas de transaminasa glutámico pirúvica o alanin aminotransferasa (ALT) aumentan ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis a las 6 semanas de evolución, pero descienden ($p < 0.01$) en las ratas colestásicas a las 8-9 semanas del p.o. respecto de su correspondiente grupo de ratas pseudo-operadas (tabla 13; figura 56). El índice AST/ALT aumenta en las ratas colestásicas, tanto a las 6 semanas ($p < 0.05$), como a las 8-9 semanas ($p < 0.001$) de evolución (tabla 13; figura 57).

La administración de ketotifén induce un incremento ($p < 0.01$) de AST y de ALT ($p < 0.05$) en las ratas con colestasis respecto de las ratas pseudo-operadas a las 8-9 semanas del p.o., pero los niveles séricos de AST en éste período del p.o. son inferiores ($p < 0.001$) respecto de los medidos a las 6 semanas de evolución (tabla 13; figura 55). La relación AST/ALT es superior ($p < 0.05$) en las ratas con colestasis a las 8-9 semanas del p.o. respecto de las ratas pseudo-operadas cuando son tratadas con ketotifén, pero el fármaco consigue reducir ($p < 0.001$) éste índice (tabla 13; figura 57).

Tabla 13. Transaminasa glutámico oxalacética (GOT o AST; U/l), transaminasa glutámico pirúvica (GPT o ALT; U/l) y cociente AST/ALT,) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	AST (U/l)	ALT (U/l)	AST/ALT
Serie I	PSO-9 (n = 15)	146,67 ^{***β} ± 77,31	53,5 ± 29,77	2,95 ⁺⁺ ± 1,52
	CMQ-9 (n = 20)	245,06 ^{**βββΦΦΦΣΣΣ} ± 78,54	27,31 ^{ΦΦΣΣ} ± 11,37	10,07 ^{ΦΦΦΣΣΣβββ} ± 3,87
Serie II	PSO-6 (n = 20)	75,5 ^{***Φ} ± 15,2	38,45 ± 12,42	2,11 ⁺⁺ ± 0,61
	CMQ-6 (n = 20)	350,3 ^{•••βββΦΦΦΣΣΣ} ± 128,77	83,8 ^{•••ΦΦΦβββΣΣΣ} ± 24,18	4,27 ^{•••ΦΣΣβ} ± 1,22
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	106,11 ^{***} ± 43,43	48,05 ± 30,12	2,60 ± 1,32
	CMQ-KTF (n = 14)	320,76 ^{••βββΦΦΦΣΣΣ} ± 102,92	84,84 ^{•••†ΦΦβββΣΣ} ± 22,89	3,86 ^{•••ββΣ} ± 1,01

Media ± desviación estándar. β p<0.05; ββ p<0.01; βββ p<0.001: valor ES respecto de PSO-6; Φ p<0.05; ΦΦ p<0.01; ΦΦΦ p<0.001: valor ES respecto de PSO-9; Σ p<0.05; ΣΣ p<0.01; ΣΣΣ p<0.001: valor ES respecto de PSO-KTF; † p<0.05; ++ p<0.01: valor ES respecto de CMQ-6; •• p<0.01; ••• p<0.001: valor ES respecto de CMQ-9; ** p<0.01; *** p<0.001: valor ES respecto de CMQ-KTF.

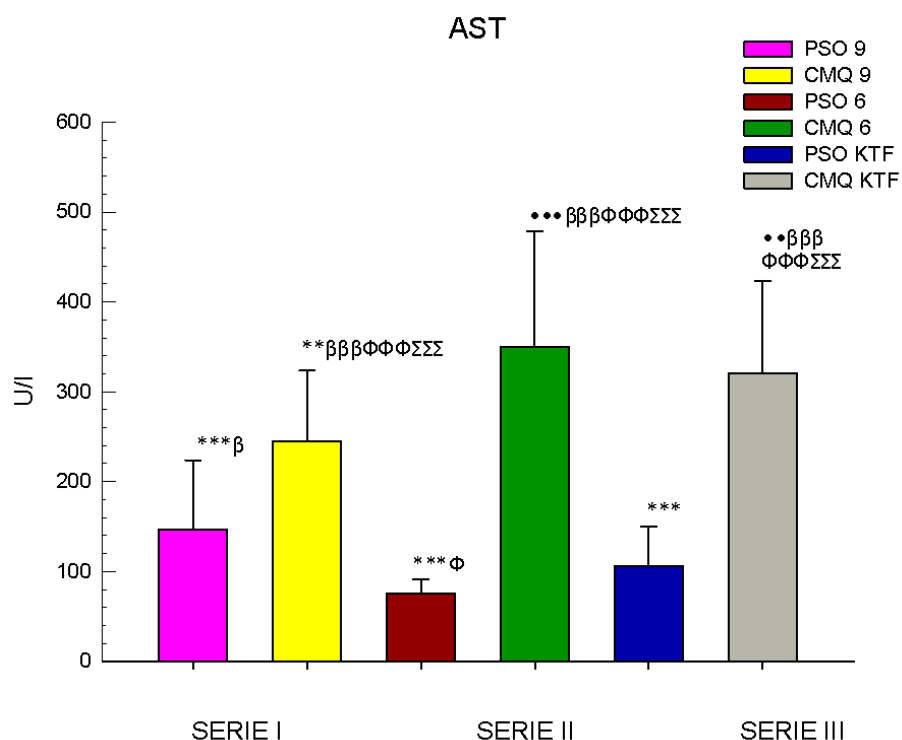


Figura 55: Transaminasa glutámico oxalacética (GOT o AST; U/l), en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \mp $p < 0.05$; $\mp\mp$ $p < 0.01$; $\mp\mp\mp$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

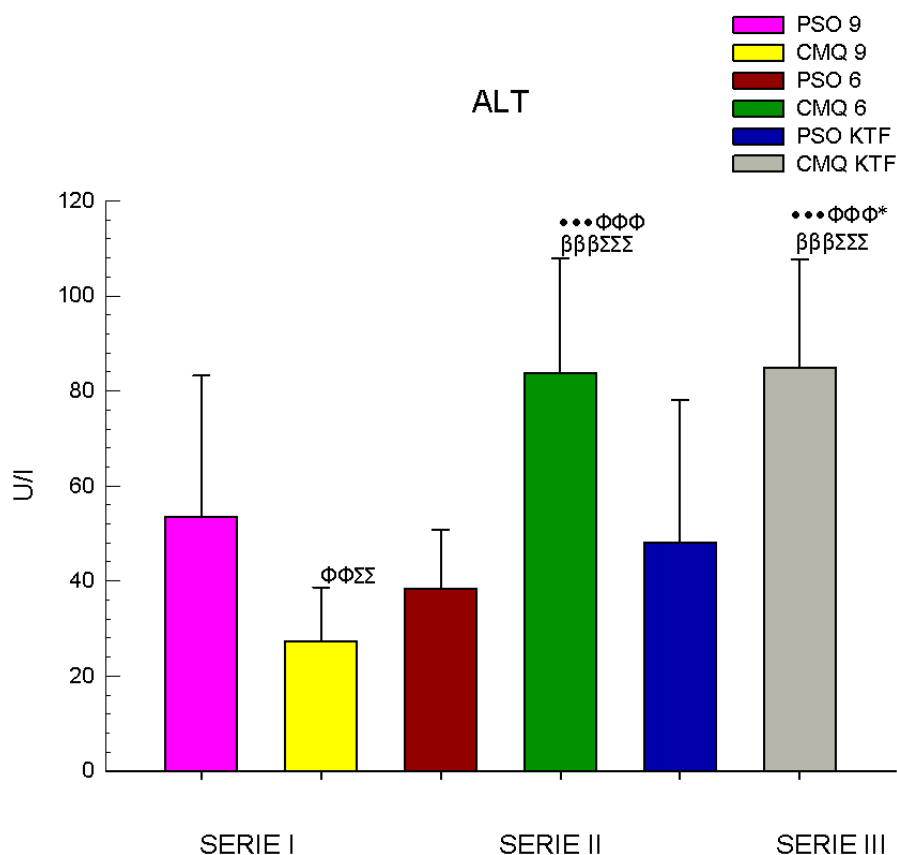


Figura 56: Transaminasa glutámico pirúvica (GPT o ALT; U/l) y cociente AST/ALT,) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi$ $p < 0.01$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\#$ $p < 0.05$; $\#\#$ $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

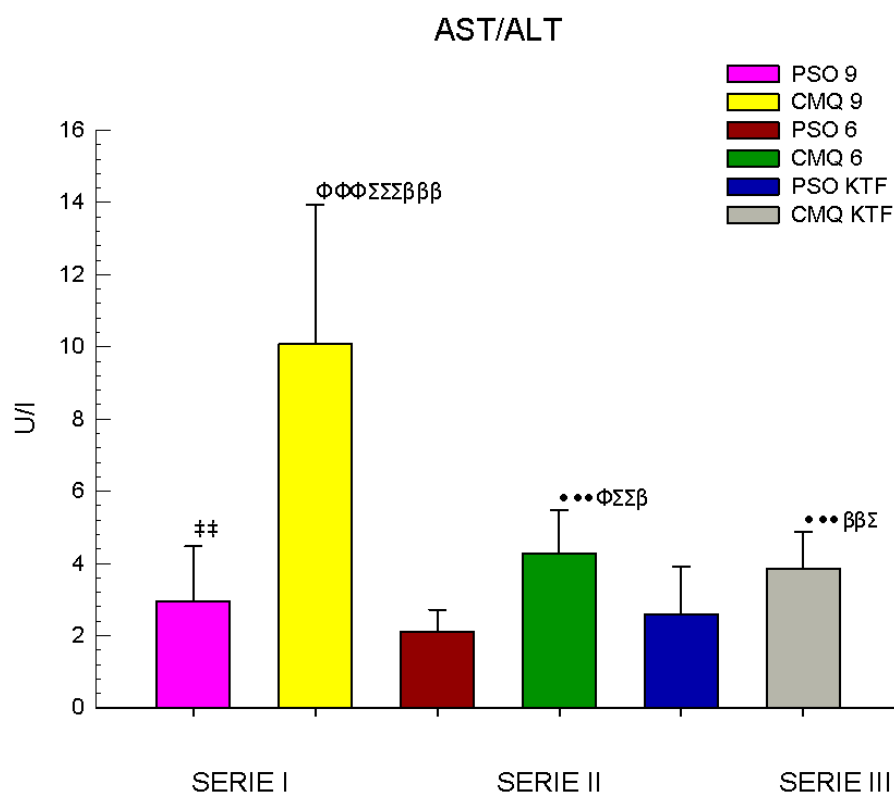


Figura 57: Cociente AST/ALT en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\#\#$ $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

Las concentraciones séricas de lactato dehidrogenasa (LDH) aumentan en las ratas colestásicas, pero sólo a las 6 semanas del p.o. ($p < 0.01$) (tabla 14; figura 58). El tratamiento diferido con ketotifén induce una disminución ($p < 0.05$) de LDH sérica a las 8-9 semanas de evolución (tabla 14; figura 58). Por el contrario, los niveles séricos de gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT) aumentan a las 6 semanas ($p < 0.001$) y a las 8-9 semanas, aunque se administre de ketotifén (tabla 14; figura 59). La fosfatasa alcalina aumenta ($p < 0.001$) en todas las ratas con colestasis, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas del p.o., y tras la administración de ketotifén (tabla 14; figura 60).

Tabla 14. Concentraciones séricas de láctico deshidrogenasa (LDH; U/l), gamma glutamil transpeptidasa (GGT; U/l) y fosfatasa alcalina (FAI; U/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	LDH (U/l)	GGT (U/l)	FAI (U/l)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	1013 ± 497,82	-	112,34 ± 34,12
	CMQ-9 (n = 20)	967,76 ^{ββ} ± 388,69	-	284,89 ^{βββΦΦΣΣΣ} ± 69,31
Serie II	PSO-6 (n = 20)	468,97 ^{ΦΦ} ± 146,3	1 ± 0	130,68 ± 32,32
	CMQ-6 (n = 20)	972,35 ^{ββ} ± 876,21	31 ^{βββΣΣΣ} ± 11,42	523,21 ^{●●●βββΦΦΣΣΣ} ± 113,9
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	741,53 ± 655,64	3,26 ± 8,7	119,25 ± 109,1
	CMQ-KTF (n = 14)	621,35 ^Φ ± 215,89	31,64 ^{βββΣΣΣ} ± 10,86	520,8 ^{●●●βββΦΦΣΣΣ} ± 138,94

Media ± desviación estándar. ββ p<0.01; βββ p<0.001: valor ES respecto de PSO-6; Φ p<0.05; ΦΦ p<0.01; ΦΦΦ p<0.001: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ p<0.001: valor ES respecto de PSO-KTF; ●●● p<0.001: valor ES respecto de CMQ-9.

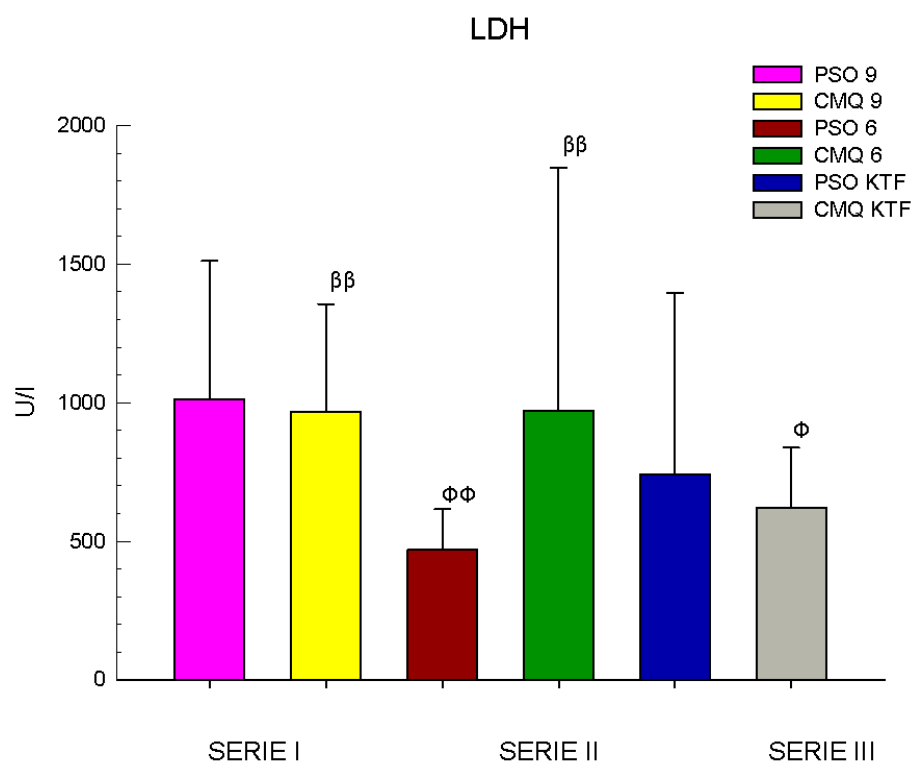


Figura 58: Concentraciones séricas de láctico deshidrogenasa (LDH; U/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta$ $p < 0.01$; valor ES respecto de PSO-6; ϕ $p < 0.05$; $\phi\phi$ $p < 0.01$; valor ES respecto de CMQ-9.

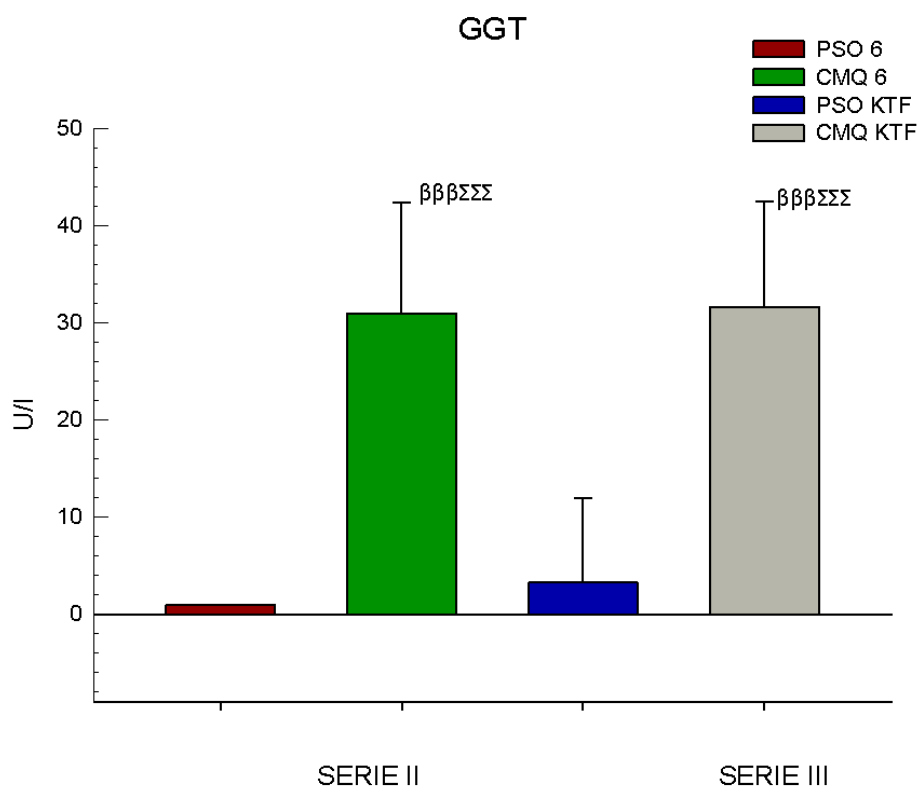


Figura 59: Concentraciones séricas de gamma glutamil transpeptidasa (GGT; U/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

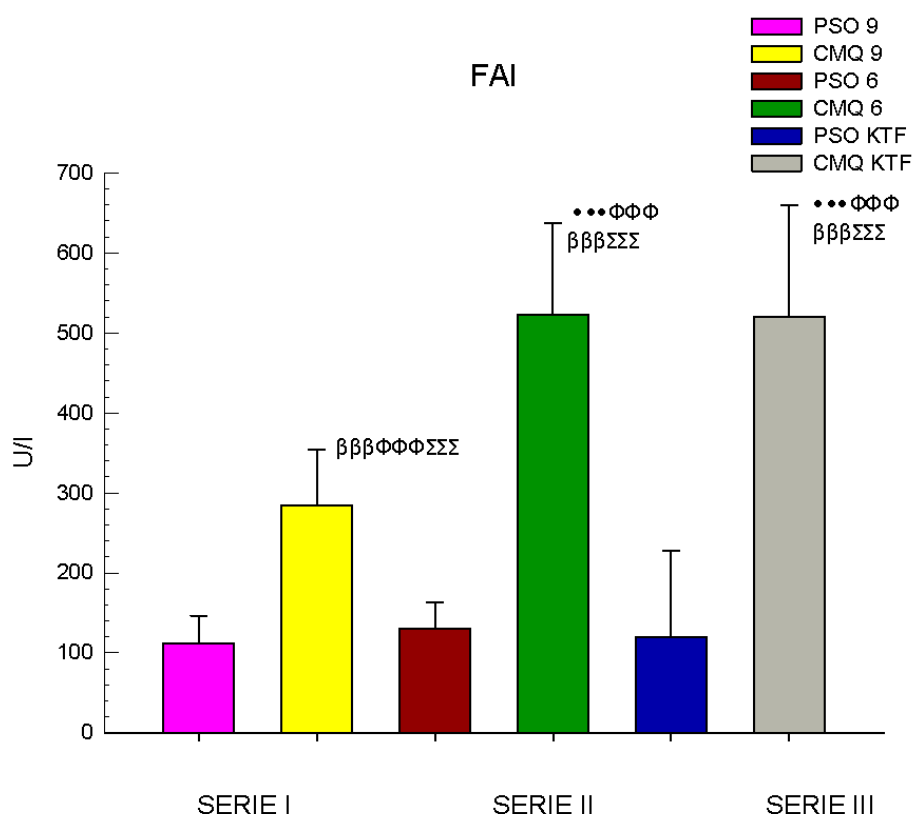


Figura 60: Concentraciones séricas de fosfatasa alcalina (FAI; U/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. βββ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

Respecto de otros parámetros marcadores de lesión biliar, los niveles séricos de bilirrubina total, bilirrubina directa y ácidos biliares aumentan ($p < 0.001$), en todos los animales colestásicos respecto de los pseudo-operados, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas de evolución p.o. (tabla 15; figuras 61, 62 y 63). La administración de ketotifén no induce cambios significativos en las concentraciones de éstos parámetros (tabla 15; figuras 61, 62 y 63).

Tabla 15. Bilirrubina total (BT; mg/dl), bilirrubina directa (BD; mg/dl), ácidos biliares ($\mu\text{mol/l}$) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	ÁcBiliares ($\mu\text{mol/l}$)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	0,09	0,01	6,78
		\pm	\pm	\pm
		0,05	0,01	2,93
	CMQ-9 (n = 20)	8,17 ^{βββΦΦΣΣΣ}	4,92 ^{βββΦΦΣΣΣ}	42,85 ^{βββΦΦΣΣΣ}
Serie II	PSO-6 (n = 20)	\pm	\pm	\pm
		1,77	1	17,62
		0,11	0,02	8,87
	CMQ-6 (n = 20)	8,78 ^{βββΦΦΣΣΣ}	4,51 ^{βββΦΦΣΣΣ}	48,88 ^{βββΦΦΣΣΣ}
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	\pm	\pm	\pm
		1,82	1,04	14,28
		0,63	0,31	5,67
	CMQ-KTF (n = 14)	7,91 ^{βββΦΦΣΣΣ}	4,16 ^{βββΦΦΣΣΣ}	51,7 ^{βββΦΦΣΣΣ}
		\pm	\pm	\pm
		2,08	1,09	28,91

Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF;

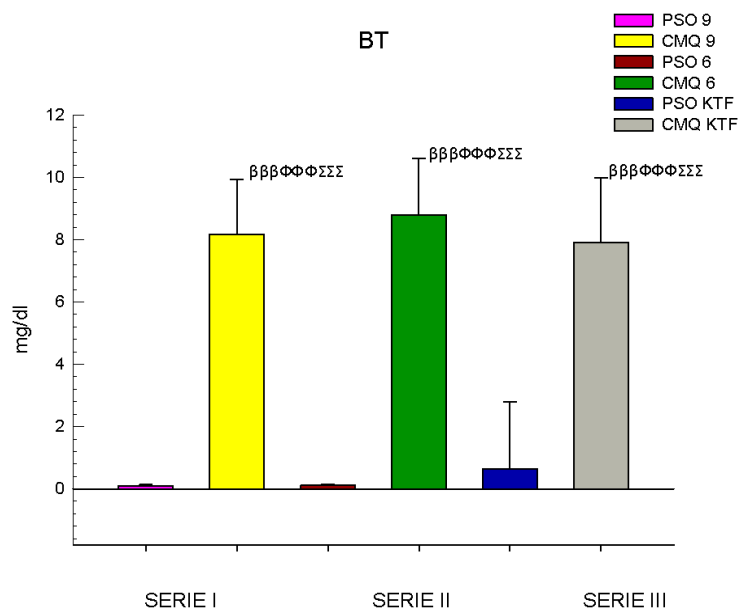


Figura 61: Concentraciones séricas de bilirrubina total (BT; mg/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

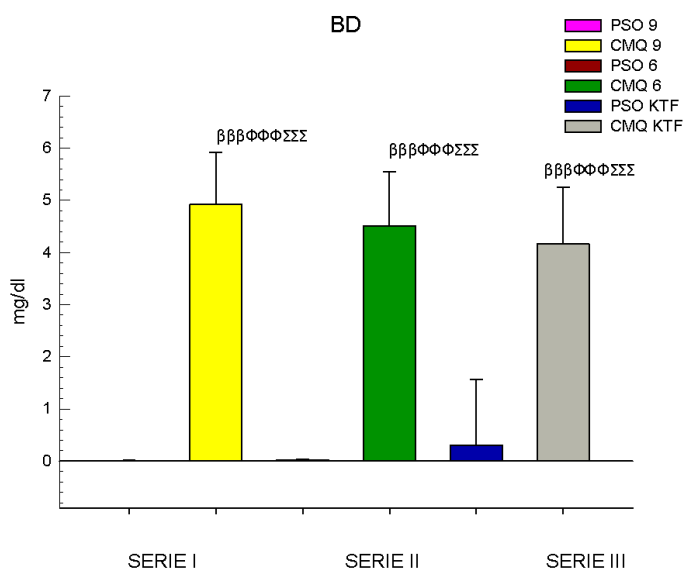


Figura 62: Concentraciones séricas de bilirrubina directa (BD; mg/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

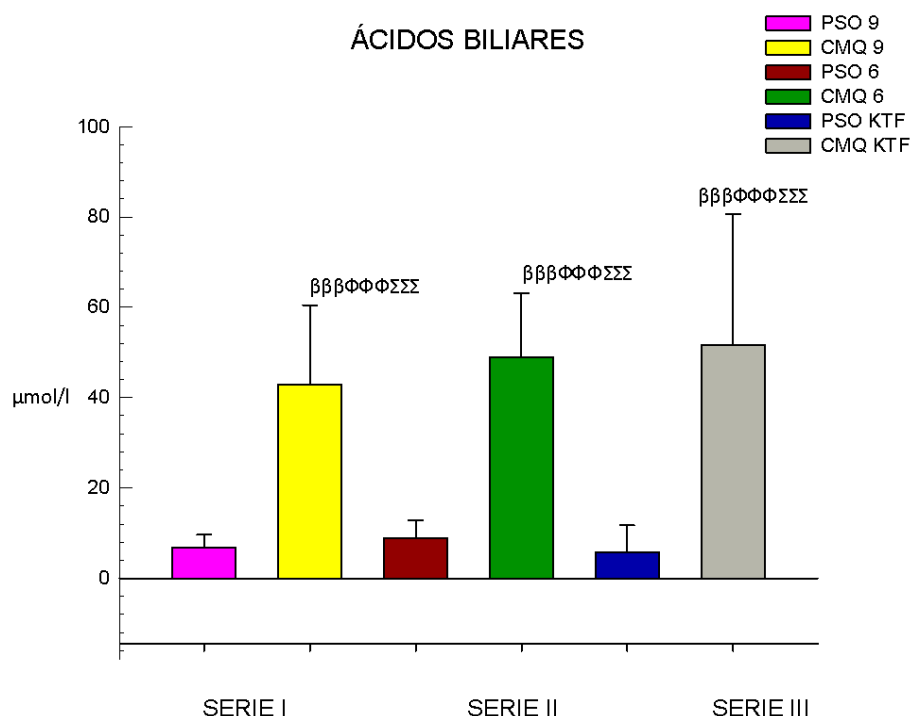


Figura 63: Concentraciones séricas de ácidos biliares en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. βββ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

Respecto de los resultados del lipidograma, los niveles de colesterol en sangre aumentan en las ratas con colestasis respecto a las pseudooperadas ($p < 0,001$) y no hay diferencias cuando se administra ketotifén (tabla 16; figura 64). Los niveles de triglicéridos no se modifican de forma significativa (tabla 16, figura 65). Las concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL; *high density lipoproteins*) disminuyen en las ratas con colestasis a las 8-9 semanas de evolución, pero la administración de ketotifén induce su incremento ($p < 0,001$). Las concentraciones séricas de lipoproteínas de baja densidad (LDL; *light density lipoproteins*) son mayores en las ratas con colestasis que en las pseudooperadas ($p < 0,001$), no existiendo diferencias tras la administración de ketotifén y, por último, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; *very low density lipoproteins*)

disminuyen ($p < 0,05$) en las ratas colestásicas y tampoco ketotifén ejerce efectos significativos (tabla 17, figuras 67, 68 y 69).

Tabla 16: Concentraciones séricas de colesterol (mg/dl), triglicéridos (mg/L) y ácidos grasos no esterificados (NEFA's) (mmol/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	Colesterol (mg/dl)	TG (mg/l)	NEFA's (mmol/l)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	63,31 ± 10,2	161,33 ± 53,54	1,39 ± 0,88
	CMQ-9 (n = 20)	143,32 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 65,47	157,69 ± 53,73	0,61 ^{ΦΦΦ} ± 0,21
	PSO-KTF (n = 15)	62,12 ± 26,72	145,32 ± 43,25	0,65 ^{ΦΦΦ} ± 0,32
Serie III	CMQ-KTF (n = 14)	151,57 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 72,84	170,83 ± 93,68	0,53 ^{ΦΦΦ} ± 0,16

Media ± desviación estándar. ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

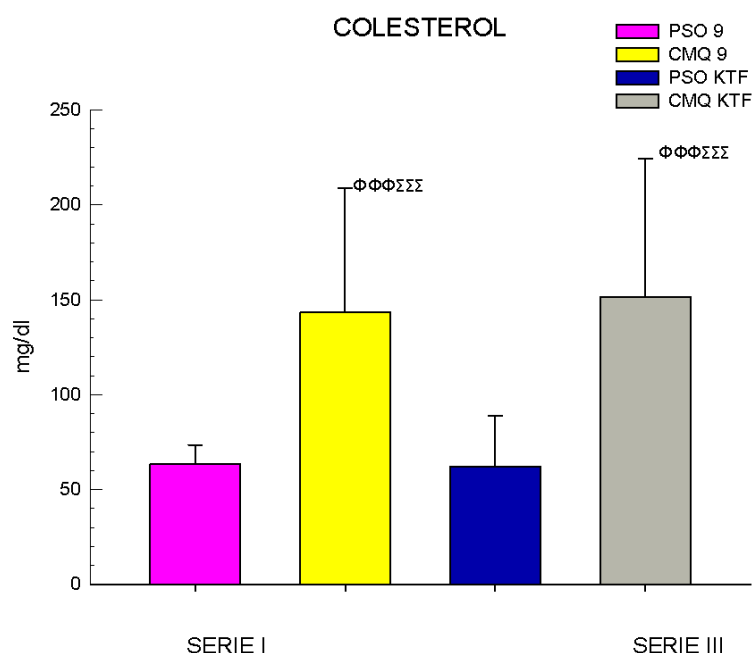


Figura 64: Concentraciones séricas de colesterol (mg/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

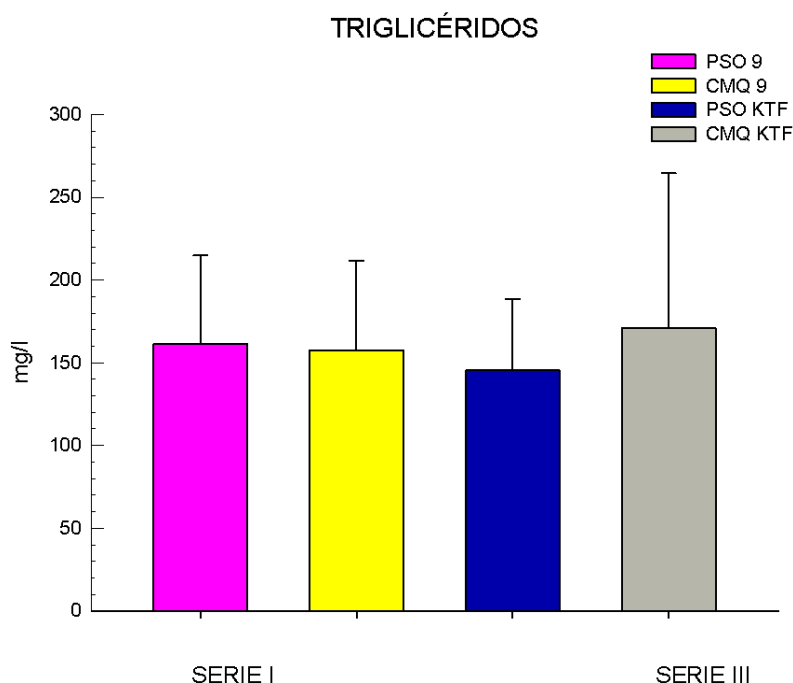


Figura 65: Concentraciones séricas de triglicéridos (mg/L) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

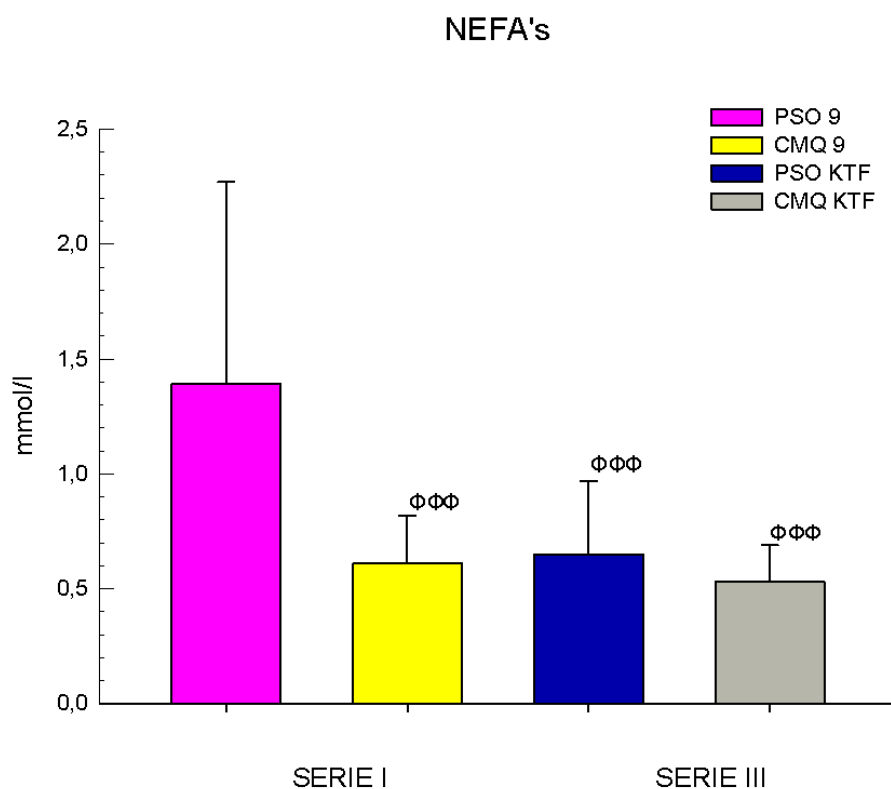


Figura 66: Concentraciones séricas de ácidos grasos no esterificados (NEFA's) (mmol/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9.

Tabla 17. Concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL-L; mmol/l), lipoproteínas de baja densidad (LDL-L; mmol/l) y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-L; mmol/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	HDL-L (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	VLDL (mmol/l)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	0,79 [•] ± 0,11	0,28 ± 0,05	0,57 ± 0,23
	CMQ-9 (n = 20)	0,66 ± 0,17	2,69 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 1,43	0,36 ^Φ ± 0,21
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	0,79 [•] ± 0,13	0,44 ± 0,71	0,38 ± 0,16
	CMQ-KTF (n = 14)	0,89 ^{•••} ± 0,22	2,83 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 1,4	0,25 ^{ΦΦ} ± 0,44

Media ± desviación estándar. Φ p<0.05; ΦΦ p<0.01; ΦΦΦ p<0.001: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ p<0.001: valor ES respecto de PSO-KTF; • p<0.05; ••• p<0.001: valor ES respecto de CMQ-9.

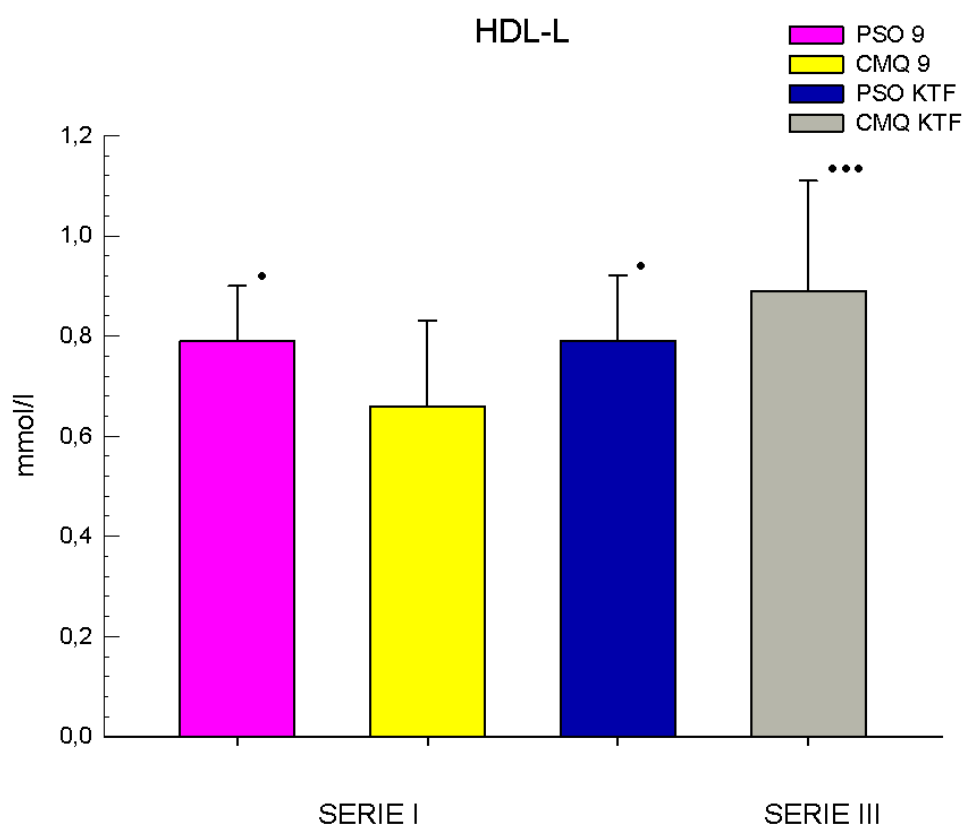


Figura 67: Concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL-L; mmol/L) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. • $p<0.05$; ••• $p<0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

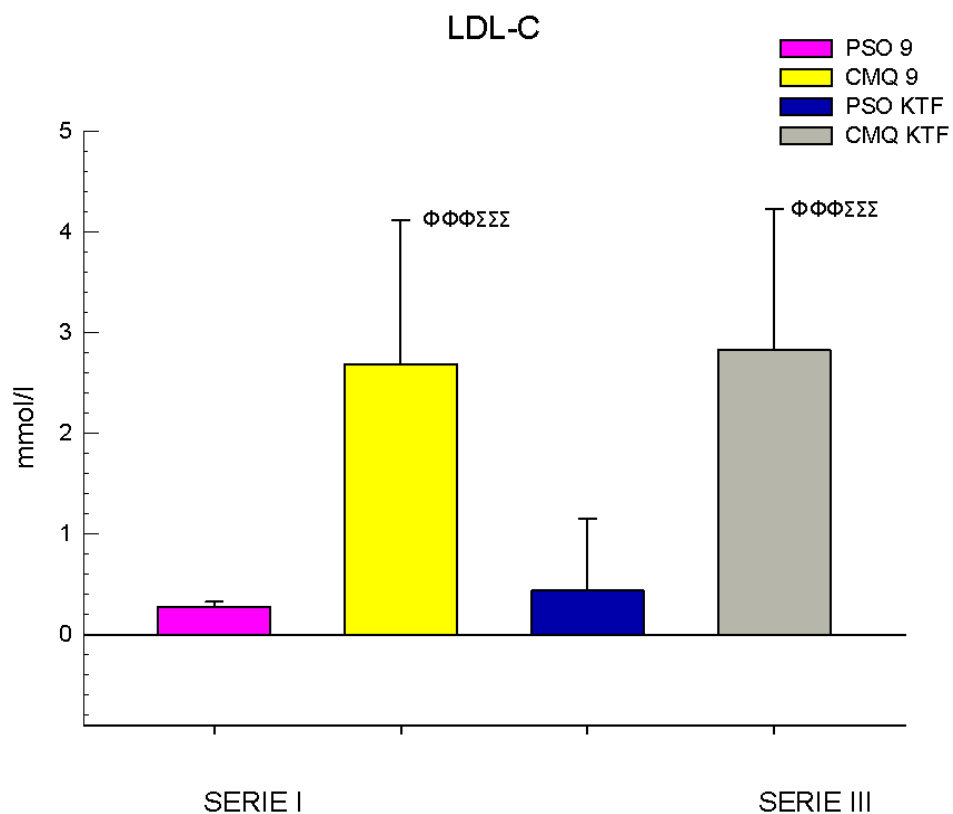


Figura 68: Concentraciones séricas de lipoproteínas de baja densidad (LDL-L; mmol/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

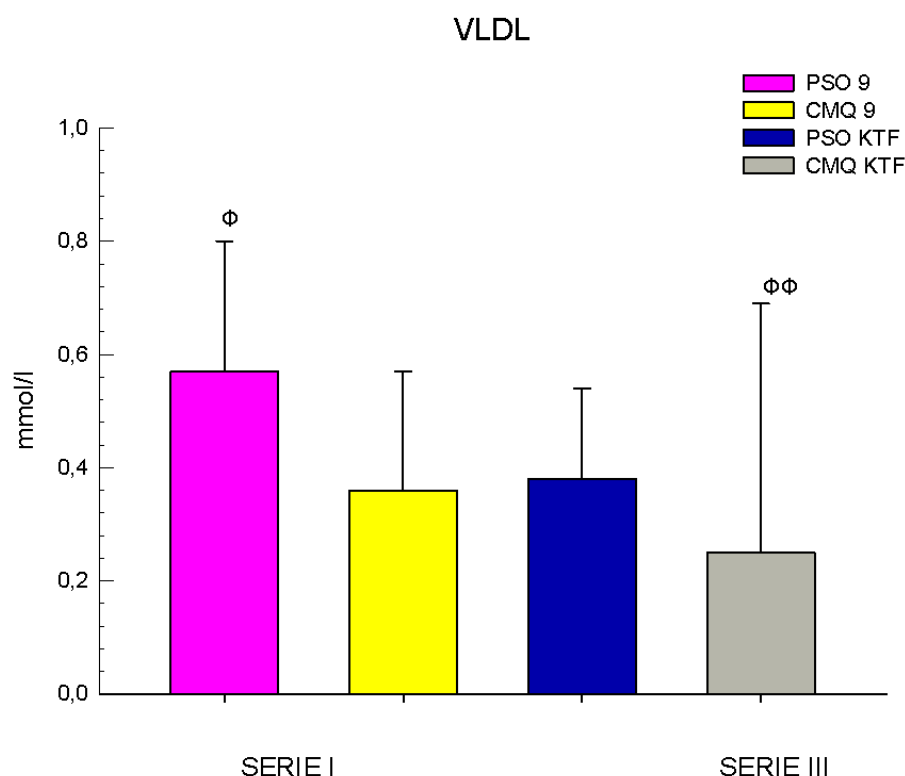


Figura 69: Concentraciones séricas de lipoproteínas de alta densidad (HDL-L; mmol/l), lipoproteínas de baja densidad (LDL-L; mmol/l) y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-L; mmol/l) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9.

Las concentraciones séricas de proteínas totales descienden ($p < 0.001$) en las ratas colestásicas respecto de los animales pseudo-operados, pero la administración de ketotifén aumenta ($p < 0.05$) dichas concentraciones (tabla 18; figura 71). Igualmente, los niveles séricos de albumina descienden de forma significativa ($p < 0.001$) en las ratas con colestasis, tanto a las 6 como a las 8-9 semanas de evolución, siendo más marcado dicho descenso a las 6 semanas del p.o. ($p < 0.001$). La administración de ketotifén reduce ($p < 0.001$) las concentraciones séricas de albúmina a las 8-9 semanas de evolución (tabla 18; figura 70).

Tabla 18. Concentraciones séricas de albúmina (ALB; g/dl) y proteínas totales (PT; g/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	Alb (g/dl)	Prot T (g/dl)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	3,02 ^{βββ} ± 0,14	5,97 ± 0,38
	CMQ-9 (n = 20)	1,63 ^{βββΦΦΦΣΣΣ} ± 0,41	4,28 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 0,97
Serie II	PSO-6 (n = 20)	2,44 ^{ΦΦΦΣΣΣ} ± 0,32	-
	CMQ-6 (n = 20)	1,26 ^{●●●βββΦΦΦΣΣΣ} ± 0,28	-
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	2,77 ^{ββ} ± 0,37	5,81 ± 0,45
	CMQ-KTF (n = 14)	1,22 ^{●●●βββΦΦΦΣΣΣ} ± 0,28	4,81 ^{ΦΦΦΣΣΣ●} ± 0,92

Media ± desviación estándar. βββ p<0.001: valor ES respecto de PSO-6; Φ p<0.05; ΦΦΦ p<0.001: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ p<0.001: valor ES respecto de PSO-KTF; ● p<0.05; ●●● p<0.001: valor ES respecto de CMQ-9.

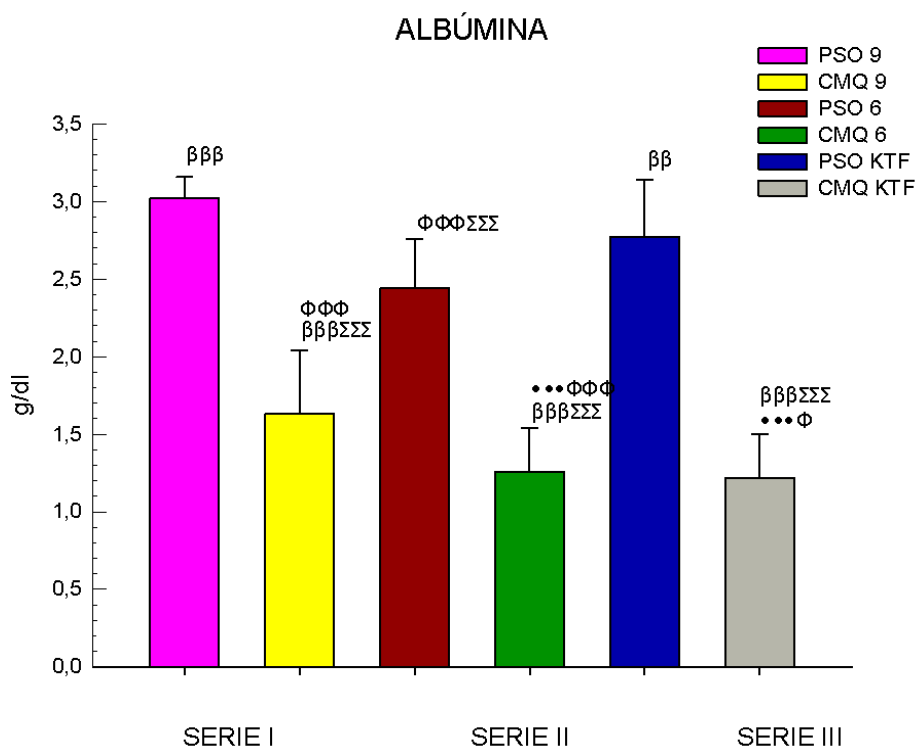


Figura 70: Concentraciones séricas de albúmina (ALB; g/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ββ: $p < 0.01$; βββ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; ΦΦΦ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

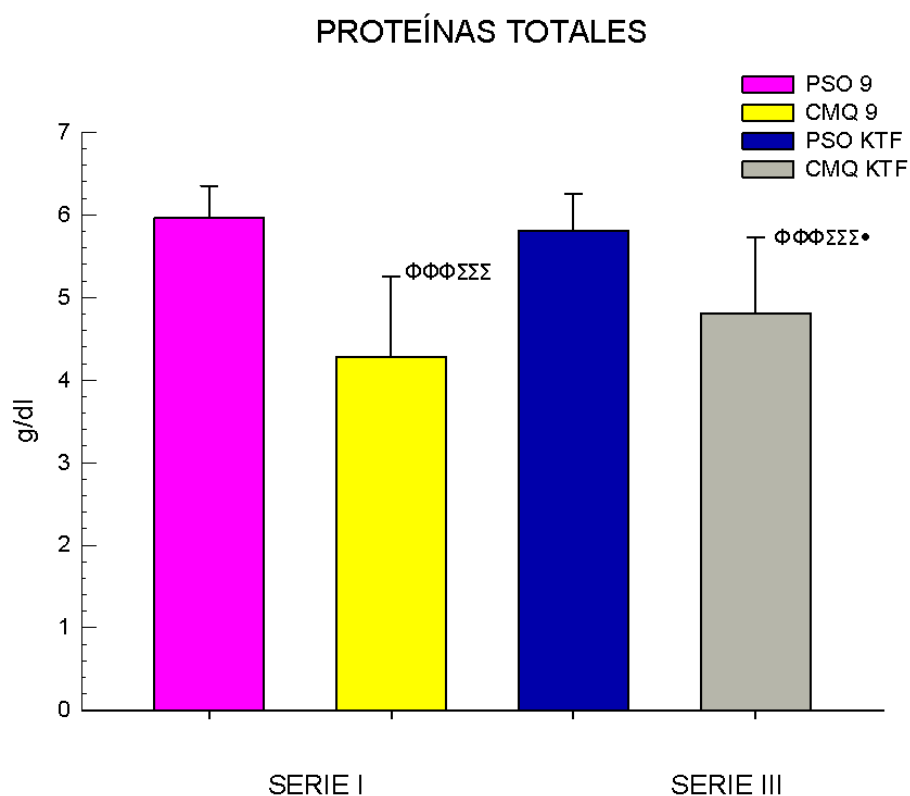


Figura 71: Concentraciones séricas de proteínas totales (PT; g/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \bullet $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-9.

Tabla 19. Concentraciones séricas de creatinina (Creat; mg/dL) y urea (mg/dl), en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	Creat (mg/dl)	Urea (mg/dl)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	0,56 ± 0,04	—
	CMQ-9 (n = 20)	0,57 ^β ± 0,07	—
Serie II	PSO-6 (n = 20)	0,52 ± 0,07	34,64 ± 3,48
	CMQ-6 (n = 20)	0,48 ^{ΦΦ●●●} ± 0,09	30,68 ^{ΣΣΣ} ± 6,94
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	0,52 ± 0,07	38,81 ± 4,65
	CMQ-KTF (n = 14)	0,46 ^{ΦΦΦβΣ●●●} ± 0,08	32,16 ^{ΣΣΣ} ± 10,41

Media ± desviación estándar. ^β $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-6; ^{ΦΦ} $p < 0.01$; ^{ΦΦΦ} $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; ^Σ $p < 0.05$; ^{ΣΣΣ} $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; ^{●●●} $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

Las concentraciones séricas de urea y de creatinina disminuyen ($p < 0.001$ y 0.05 , respectivamente) en las ratas con colestasis a las que se administra ketotifén ($p < 0,001$) respecto de las pseudooperadas (tabla 19, figura 72). Además, las concentraciones séricas de creatinina en las ratas colestásicas a las 8-9 semanas del p.o. cuando se administra ketotifén son inferiores ($p < 0.001$) respecto de las ratas con colestasis en el mismo período evolutivo (tabla 19; figura 72).

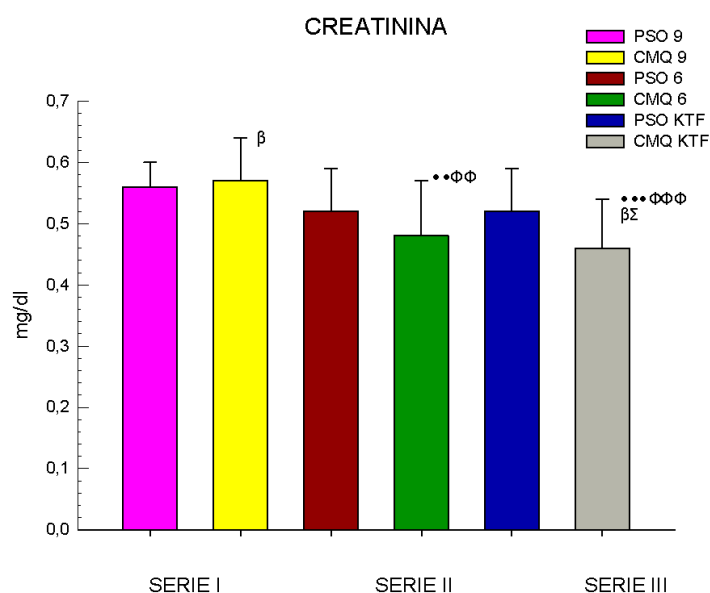


Figura 72: Concentraciones séricas de creatinina (Creat; mg/dL) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi$ $p < 0.01$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

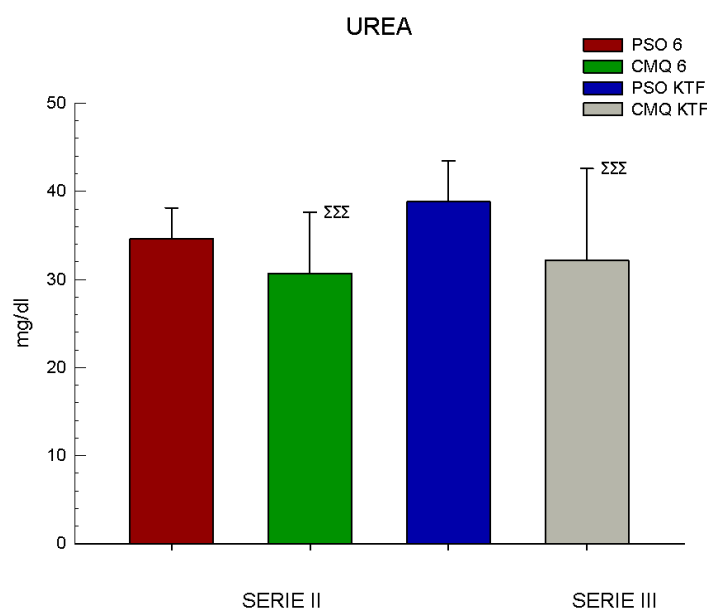


Figura 73: Concentraciones séricas de urea (mg/dl) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

Tabla 20. Concentraciones séricas de factor de crecimiento β (TGF- β 1; ng/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

SERIE	GRUPO	TGF- β 1 (ng/ml)
Serie I	PSO-9 (n = 15)	45,84 ± 42,63
	CMQ-9 (n = 20)	34,46 ± 14,01
Serie III	PSO-KTF (n = 15)	31,77 ± 53,01
	CMQ-KTF (n = 14)	41,95 ± 21,68

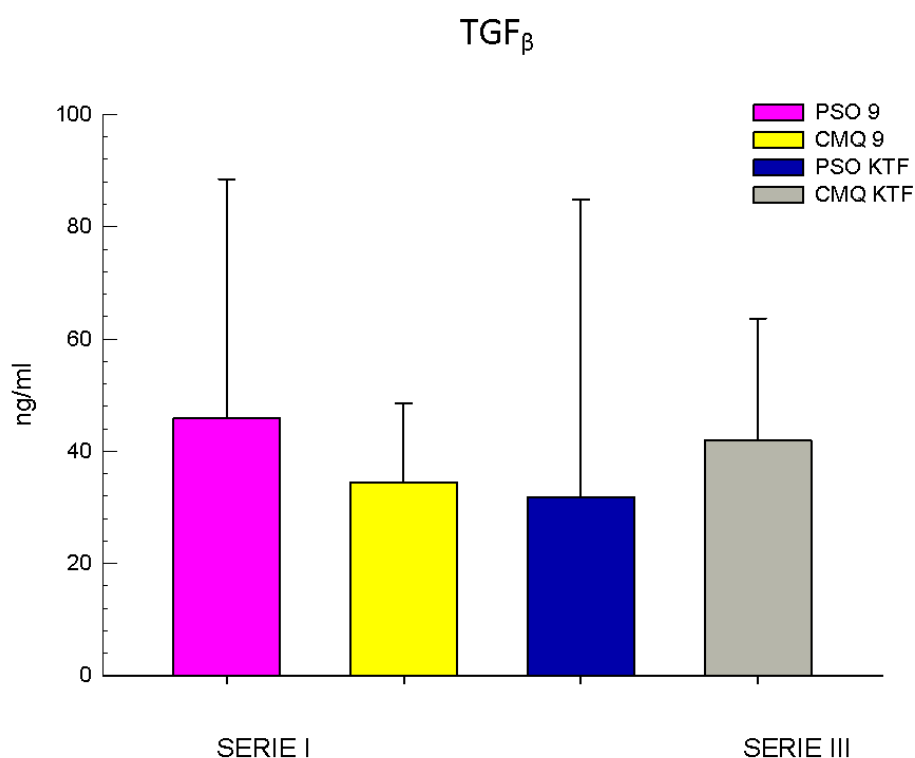


Figura 74: Concentraciones séricas de factor de crecimiento β (TGF- β 1; ng/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Las concentraciones séricas de factor de crecimiento transformador beta-1 (*transforming growth factor-β1*) no muestran cambios significativos entre las ratas pseudo-operadas y las colestásicas y la administración de ketotifén no las altera (tabla 20; figura 74).

11. HISTOPATOLOGÍA HEPÁTICA

11.A. Alteraciones histopatológicas hepáticas

En los animales con colestasis el estudio histológico permite objetivar una importante alteración de la arquitectura hepática. Se produce una intensa proliferación ductular biliar ($5,71 \pm 1,92$ vs $1,15 \pm 0,28$; $p=1,54 \times 10^{-9}$), que substituye amplias zonas de parénquima hepatocitario como consecuencia de una necrosis submasiva de este último. Es característica la presencia de una fibrosis periductal muy marcada, hepatocitos apoptóticos y otros con anisonucleosis, asociado con una mínima esteatosis microvesicular. No se observan colangitis ni signos de inflamación aguda. Todas estas alteraciones son más marcadas en las ratas colestásicas a las 8-9 semanas de evolución respecto de las ratas estudiadas en un período evolutivo previo (6 semanas). Así, a largo plazo se comprueba la existencia de un moderado componente inflamatorio peribiliar de tipo mixto que infiltra de forma difusa todo el parénquima hepático y signos de regeneración hepática con hepatocitos en mitosis (figura 75).

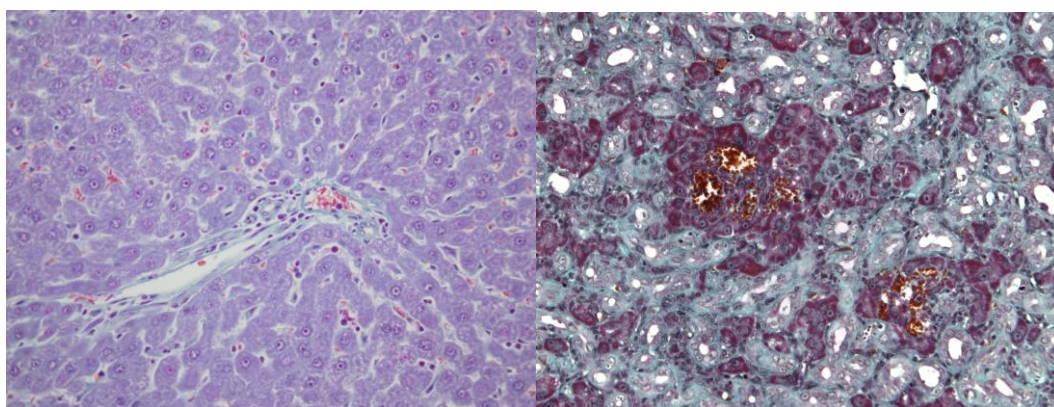


Figura 75: Imágenes microscópicas hepáticas de una rata pseudo-operada (izda) y de una rata con colestasis microquirúrgica a las 8 semanas del p.o.(dcha) (Masson 200X; Masson 20X)

11.B. Medición de la fibrosis hepática mediante tinción con rojo sirio

El grado de fibrosis hepática medido tras la tinción específica de las fibras de colágeno con rojo sirio es mayor en las ratas con colestasis ($p<0,001$), tanto a las 6 como a las 8-9 semanas del p.o. al compararlas con las pseudooperadas (tabla 21; figura 76), siendo mayor la fibrosis cuando se administra ketotifén ($p<0,05$) (tabla 21, figura 76).

Tabla 21. Grado de fibrosis tisular medido con rojo sirio en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	%
Serie I	PSO-9 (n = 20)	1,46 \pm 0,44
	CMQ-9 (n = 20)	21,85 ^{ΣΣΣβββΦΦΦ} \pm 7,38
Serie II	PSO-6 (n = 13)	1,59 \pm 0,31
	CMQ-6 (n = 20)	24,59 ^{ΣΣΣβββΦΦΦ} \pm 5,82
Serie III	PSO-KTF (n = 11)	0,95 \pm 0,29
	CMQ-KTF (n = 10)	25,77 ^{●ΣΣΣβββΦΦΦ} \pm 2,96

Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p<0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p<0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p<0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \bullet $p<0.05$: valor ES respecto de CMQ-9.

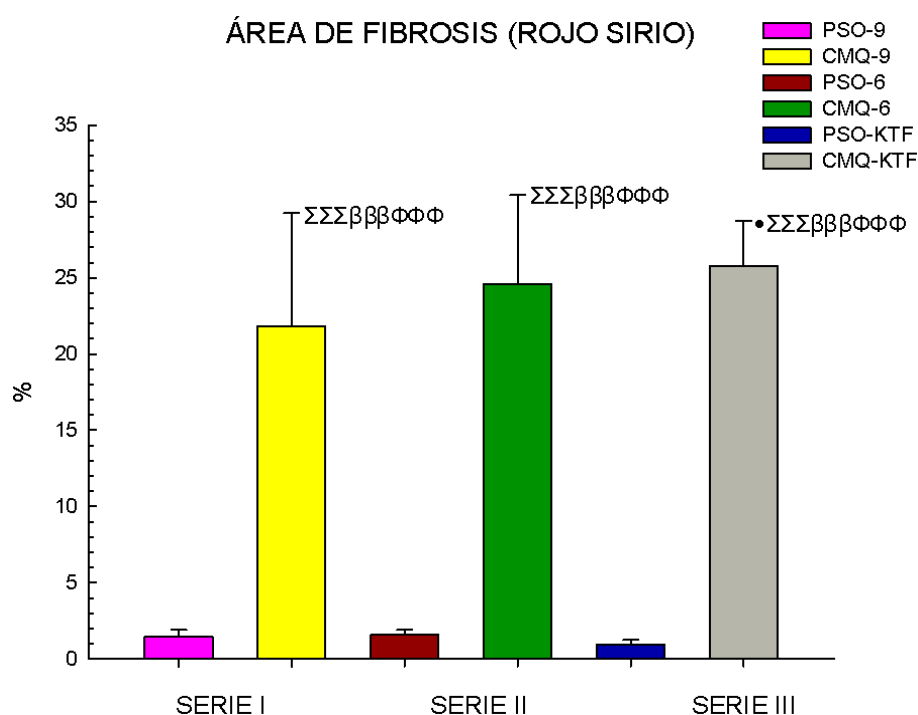
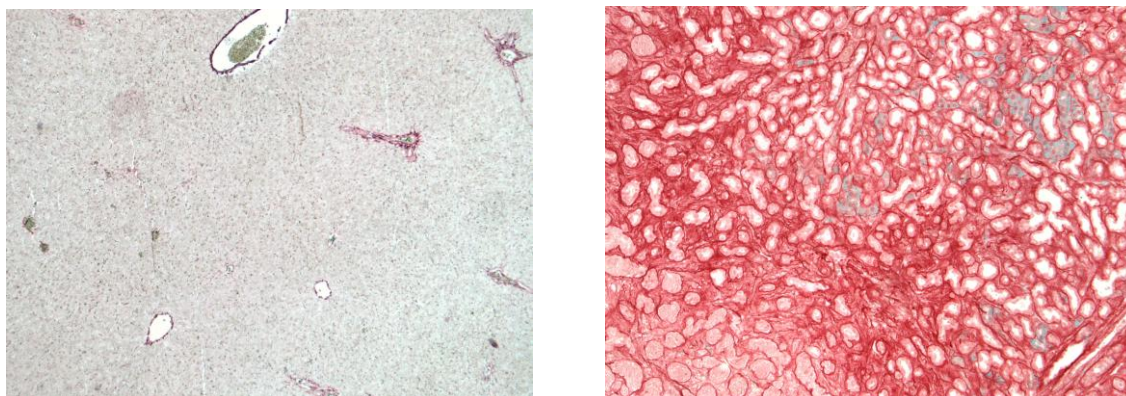


Figura 76: Grado de fibrosis tisular medido con rojo sirio en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9) (imagen superior izquierda), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) (imagen superior derecha); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; • $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-9.

12. CONCENTRACIONES TISULARES DE MEDIADORES INFLAMATORIOS

12. A. MEDIADORES DE OXIDACION

12.A. 1. Niveles tisulares de catalasa

La concentración de catalasa en hígado y ganglios mesentéricos no demuestra diferencias significativas entre los distintos grupos. Si se aprecia una disminución de ella en el íleon de las ratas con colestasis al tratarlas con ketotifén ($p < 0,01$) (tabla 22; figuras 77, 78 y 79).

Tabla 22: Niveles tisulares de catalasa en hígado, íleon y ganglios mesentéricos ($\mu\text{mol/mg}$) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO ($\mu\text{mol/mg}$)	ÍLEON ($\mu\text{mol/mg}$)	CLMS ($\mu\text{mol/mg}$)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	3,32 \pm 0,34	1,05 \pm 0,1	2,44 \pm 1,2
	CMQ-9 (n = 5)	2,72 \pm 0,66	1,97* \pm 1,08	1,04 \pm 0,29
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	3,4 \pm 0,86	2,84 $\Phi\Phi^{**}$ \pm 0,81	2,67 Φ \pm 0,57
	CMQ-KTF (n = 5)	3,4 \pm 0,38	0,6 \pm 0,43	1,49 \pm 0,39

Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

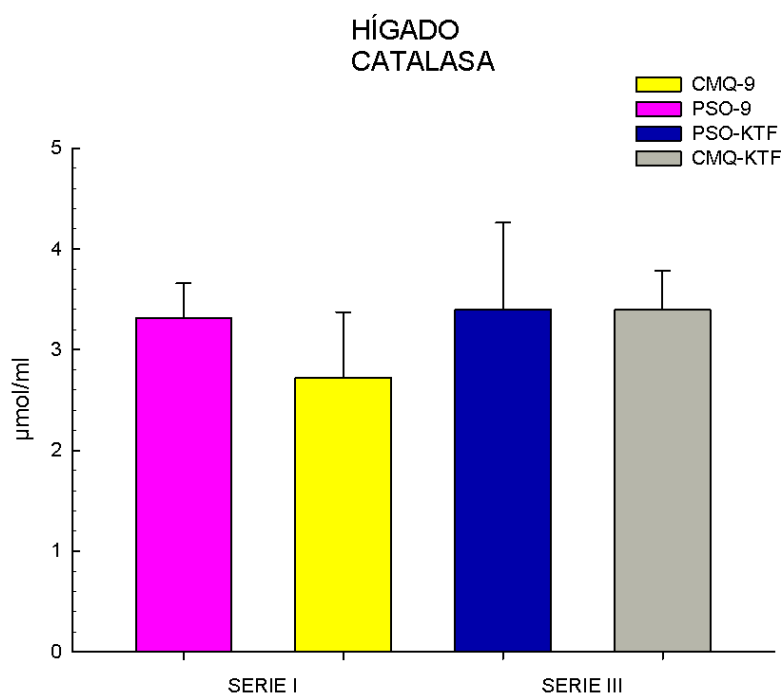


Figura 77: Niveles tisulares de catalasa en hígado ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

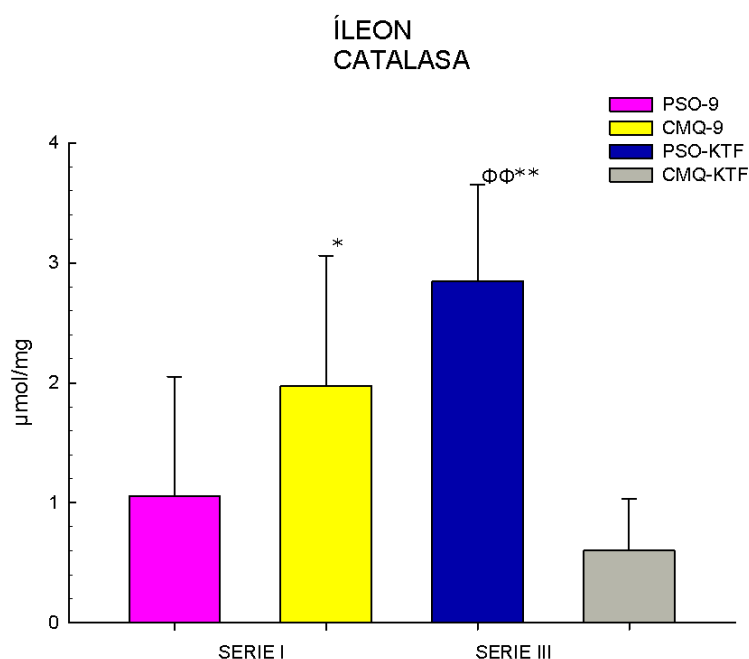


Figura 78: Niveles tisulares de catalasa en íleon ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

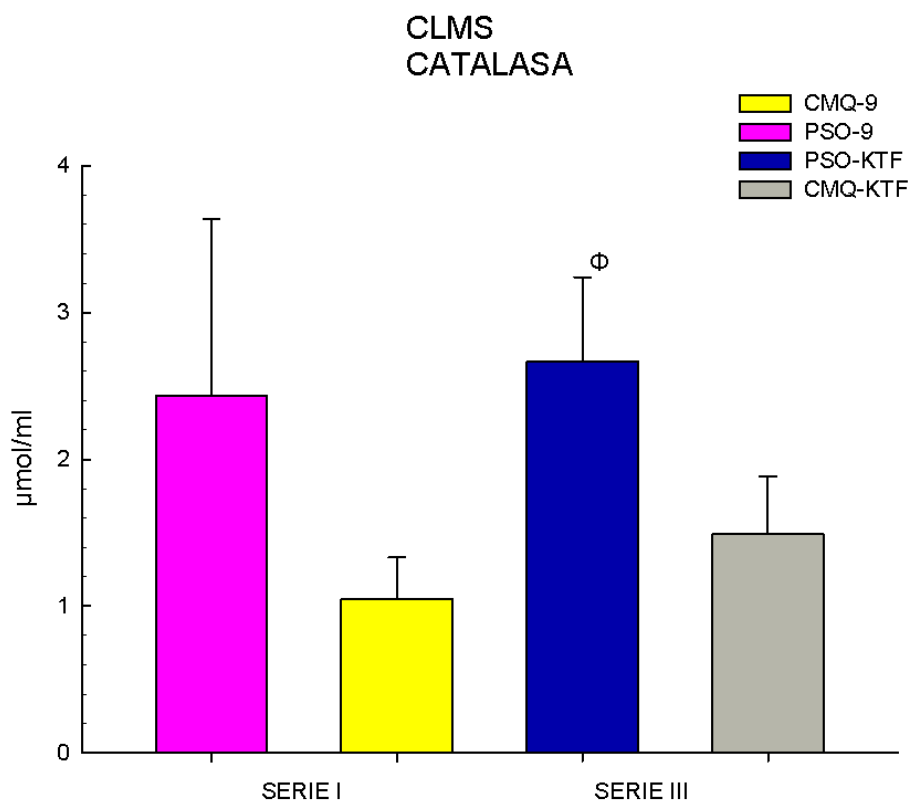


Figura 79: Niveles tisulares de catalasa en ganglios mesentéricos ($\mu\text{mol}/\text{mg}$) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9.

12.A.2. Niveles tisulares de glutatión transferasa

La concentración de glutatión transferasa se encuentra disminuida en el hígado de las ratas con colestasis ($p < 0,001$) sin que se encuentren diferencias con el tratamiento con ketotifén. En íleon y ganglios mesentéricos no hay diferencias significativas (tabla 23; figuras 80, 81 y 82)

Tabla 23: Niveles tisulares de glutatión transferasa en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO	ÍLEON	CLMS
Serie I	PSO-9 (n = 5)	4882,69 ^{●●●***} \pm 1161,66	3326,71 \pm 2511,55	718,35 ^{●*} \pm 330,9
	CMQ-9 (n = 5)	1681,9 \pm 354,42	1923,4 \pm 1174,5	321,5 \pm 40,54
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	6429,42 ^{ΦΦ●●●***} \pm 858,52	2584,49 \pm 982,12	577,33 \pm 296,83
	CMQ-KTF (n = 5)	1439,36 \pm 376,84	1921,82 \pm 519,61	268,39 \pm 46,99

Media \pm desviación estándar. ΦΦ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; ● $p < 0.05$; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

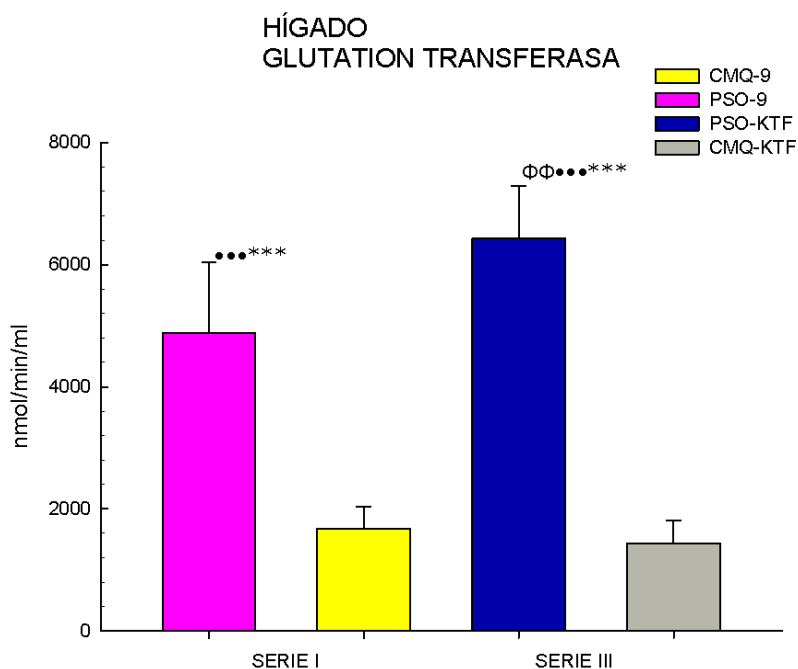


Figura 80: Niveles tisulares de glutathione transferasa en hígado (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $****$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

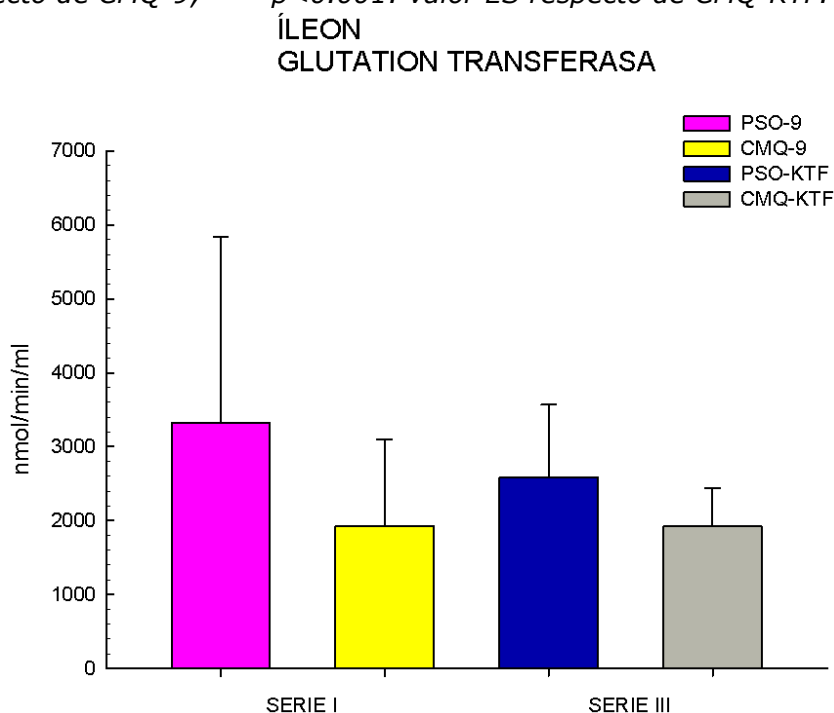


Figura 81: Niveles tisulares de glutathione transferasa en íleon (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

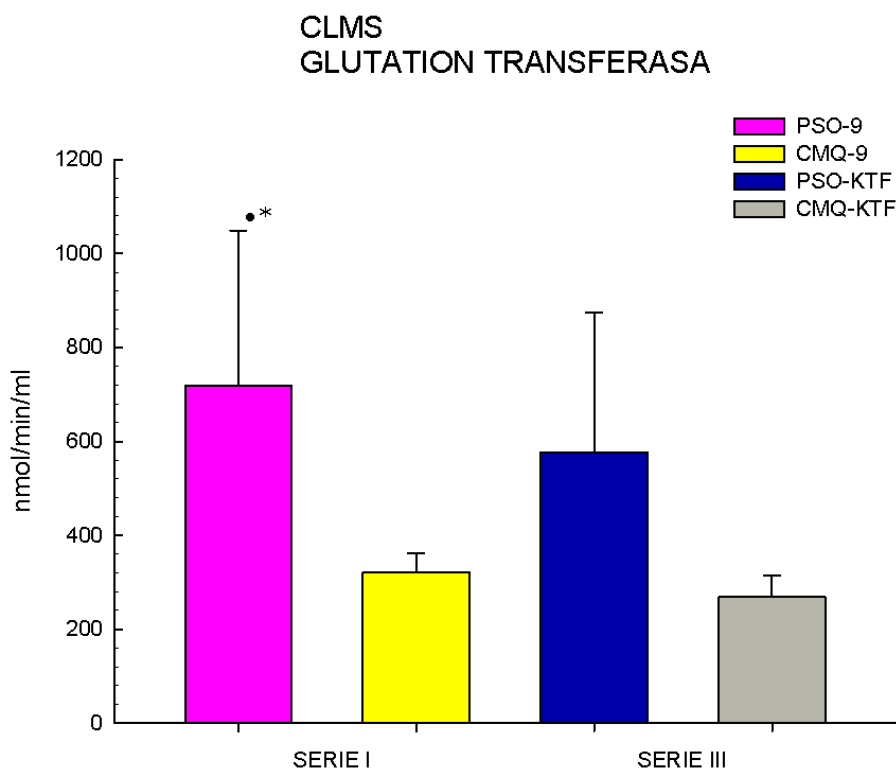


Figura 82: Niveles tisulares de glutathione transferasa en ganglios mesentéricos (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; \bullet $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

12. A.3. Niveles tisulares de glutathione peroxidasa

En el hígado se aprecia un aumento ($p < 0,001$) de las concentraciones de glutathione peroxidasa en las ratas pseudooperadas sacrificadas a las 9 semanas con respecto a las colestásicas y a las que son tratadas con ketotifén (tabla 24; figuras 83, 84 y 85).

Tabla 24: Niveles tisulares de glutatión peroxidasa en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO	ÍLEON	CLMS
Serie I	PSO-9 (n = 5)	5450,4 ^{ΦΦΦ●●●***} \pm 848,55	1008,58 [*] \pm 334,68	876,14 \pm 99,1
	CMQ-9 (n = 5)	2750,67 \pm 309,85	799,73 [*] \pm 315,18	962,71 [*] \pm 13,48
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	2258,26 \pm 1652,68	1130,83 ^{**} \pm 239,25	987,9 [*] \pm 342,24
	CMQ-KTF (n = 5)	2534,17 \pm 178,28	865,95 \pm 474,97	529,73 \pm 265,47

Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

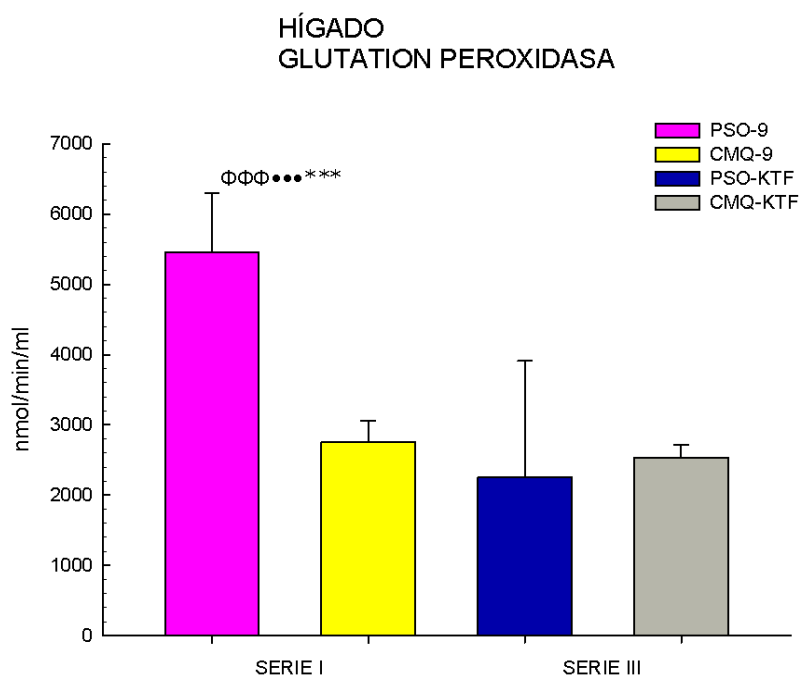


Figura 83: Niveles tisulares de glutathione peroxidasa en hígado (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. ΦΦΦ $p<0.001$: valor ES respecto de PSO-9; *** $p<0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

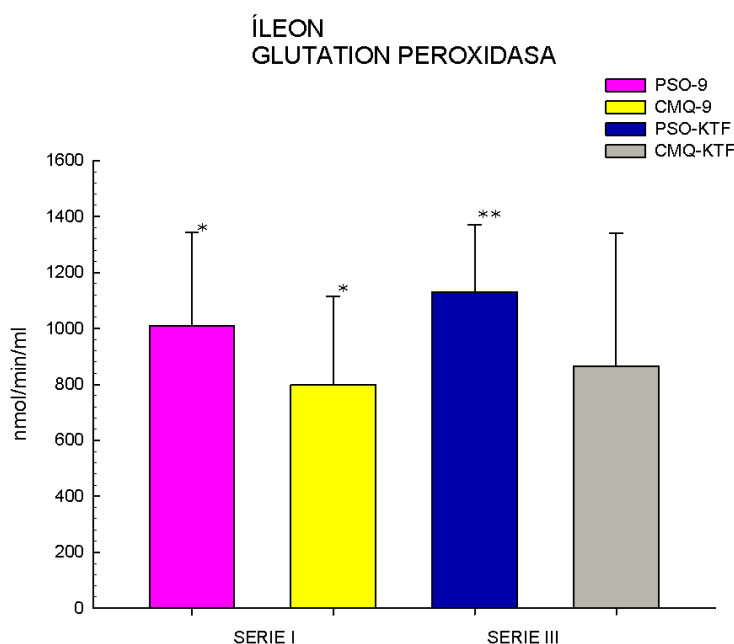


Figura 84: Niveles tisulares de glutathione peroxidasa en íleon (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. * $p<0.05$; ** $p<0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF..

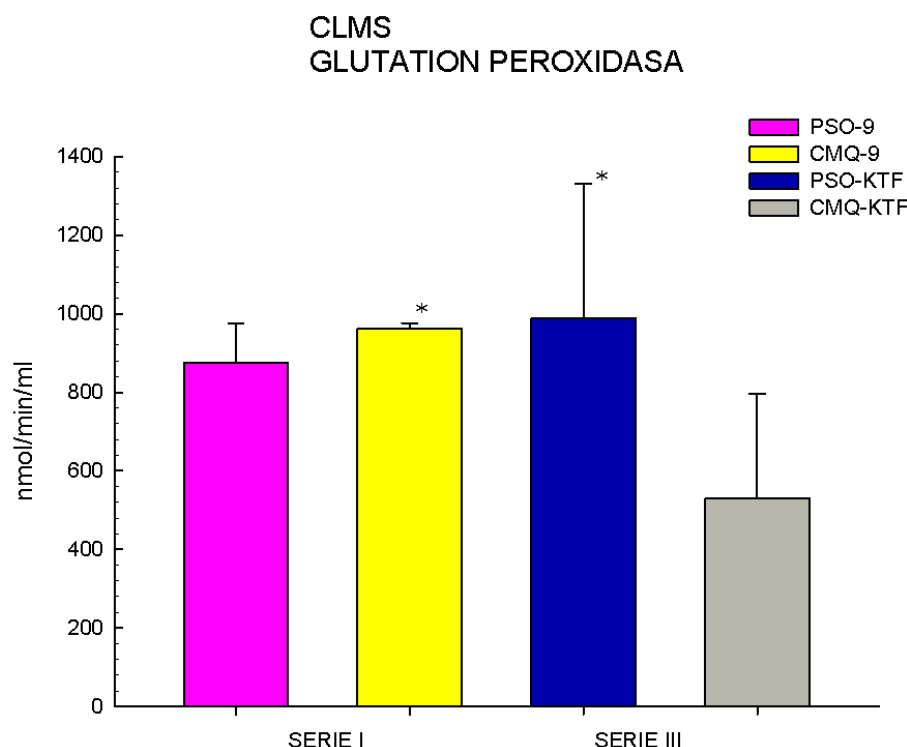


Figura 85: Niveles tisulares de glutathione peroxidase en ganglios mesentéricos (nmol/min/ml) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. * $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

12.B. QUIMIOQUINAS

12.B.1. Niveles tisulares de proteína quimioatrayente de macrófagos

La administración de ketotifén supone una disminución en las concentraciones de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) ($p < 0,001$) tanto en hígado como en íleon y en ganglios mesentéricos al comparar las ratas con colestasis. En los animales sacrificados a las 9 semanas y con una colestasis microquirúrgica practicada, los niveles aumentan notablemente con respecto a los pseudooperados ($p < 0,001$) (tabla 25; figuras 86, 87 y 88).

Tabla 25: Niveles tisulares de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	419,52 \pm 40,49	222,06 ^{$\beta\beta\Sigma\pm\pm$} ** \pm 78,46	286,06 ^{$\beta\beta\Sigma\Sigma\Sigma$} ++++ \pm 171,09
	CMQ-9 (n = 5)	993,45 ^{$\Phi\Phi\Phi\Sigma\Sigma\Sigma$} *** \pm 433,67	464,84 ^{$\beta\beta\beta\Phi\Phi$} $\Phi\Sigma\Sigma\Sigma++++*$ \pm 190,05	381,65 ^{$\beta\beta\beta\Phi\Phi\Sigma$} $\Sigma\Sigma++++*$ \pm 213,75
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	235,24 \pm 40,1	72,69 \pm 30,07	44,07 \pm 19,83
	CMQ-KTF (n = 5)	276,61 \pm 150,23	59,1 \pm 34,16	110,66 ^{$\beta\Sigma\pm$} \pm 95,03

Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi$ $p < 0.01$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \pm $p < 0.05$; $\pm\pm$ $p < 0.01$; $\pm\pm\pm$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

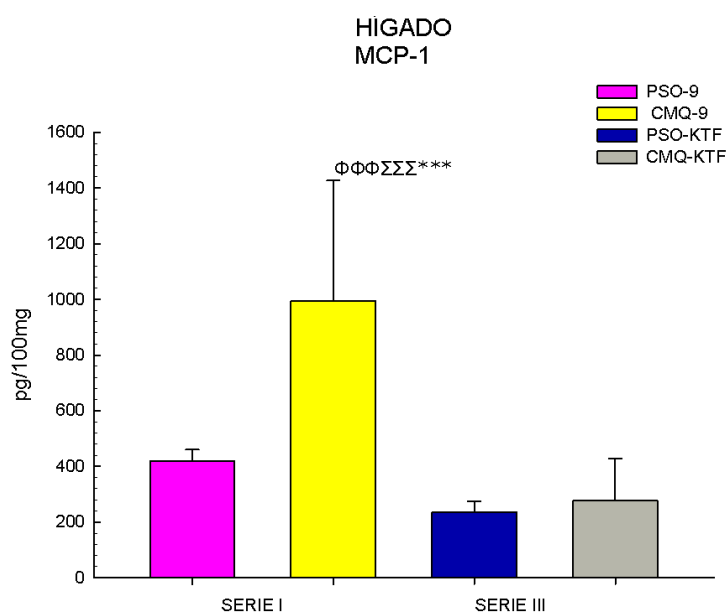


Figura 86: Niveles tisulares de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

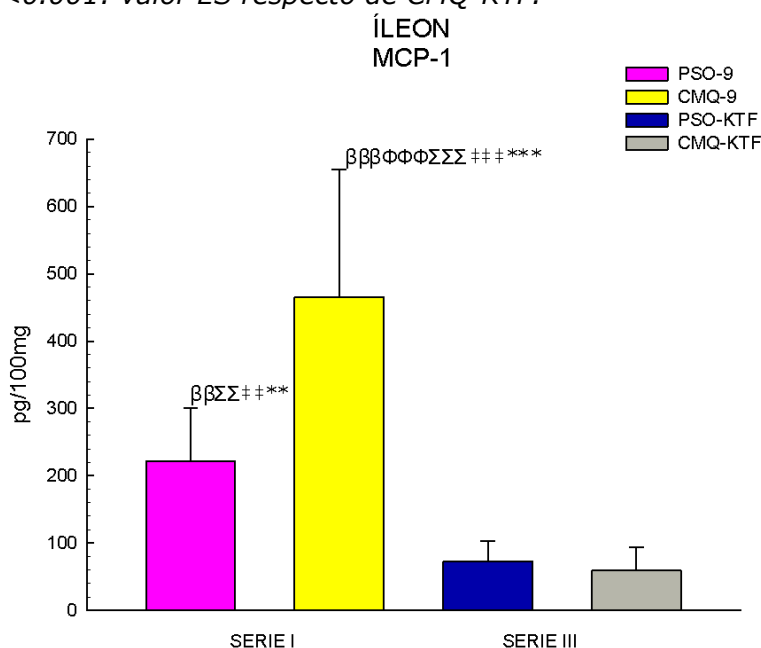


Figura 87: Niveles tisulares de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $##$ $p < 0.01$; $###$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

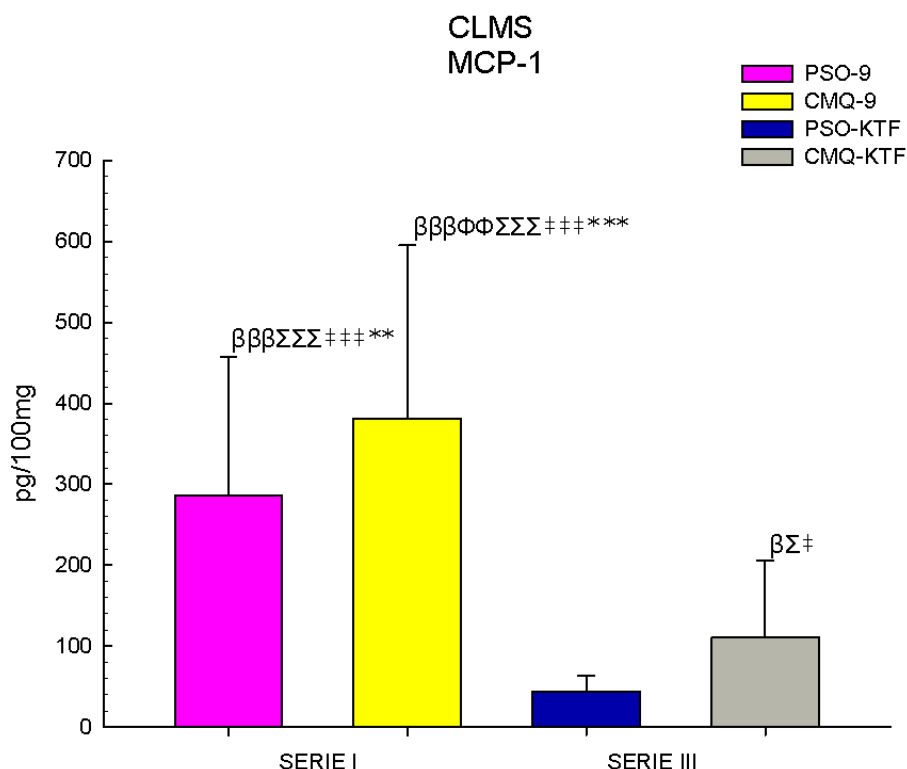


Figura 88: Niveles tisulares de proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) en ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. βββ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; ΦΦ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; ΣΣΣ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; +++ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

12.C. CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS

12.C.1. Niveles tisulares de interleuquina-1beta (IL-1β)

Los niveles de interleuquina 1 en hígado e íleon son mayores en las ratas pseudooperadas sacrificadas a las 9 semanas al compararlas con el resto de los grupos ($p < 0,001$). Los niveles en los ganglios del mesenterio aumentan notablemente en las ratas con colestasis especialmente en el grupo mencionado previamente ($p < 0,001$) (tabla 26; figuras 89, 90 y 91).

Tabla 26: Niveles tisulares de interleuquina 1beta (IL-1 β) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	1965,43 ^{ΣΣΣβββ+++•} ± 260,63	970,39 ^{ΣΣΣβββ+++•} ± 60,78	618,09 [‡] ± 9,96
		••***	••***	
	CMQ-9 (n = 5)	347,39 ± 147,58	368,38 ± 57,12	1115,65 ^{ΣΣΦβββ} ± 38,96

Serie II	PSO-6 (n = 5)	593 ± 41,94	99,67 ± 14,69	107,69 ^{Φ**} ± 66,09
	CMQ-6 (n = 5)	364,19 ^{ΣΦ} ± 13,03	146,07 ^β ± 7,47	257,36 ± 37,5
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	884,76 ± 54,86	431,66 ± 115,12	483,82 ± 194,78
	CMQ-KTF (n = 5)	495,26 ^{ΣΦ} ± 153,05	140,29 ± 17,35	631,04 ± 194,6

Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $‡$ $p < 0.05$; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $•••$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $*$ $p < 0.05$; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

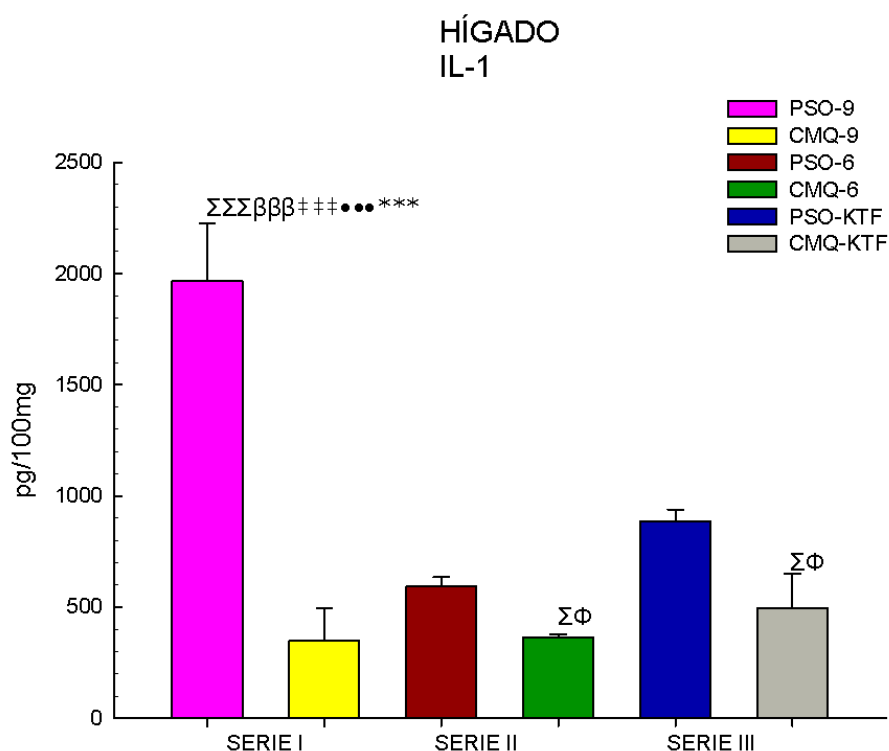


Figura 89: Niveles tisulares de interleuquina 1beta (IL-1 β) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $...$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

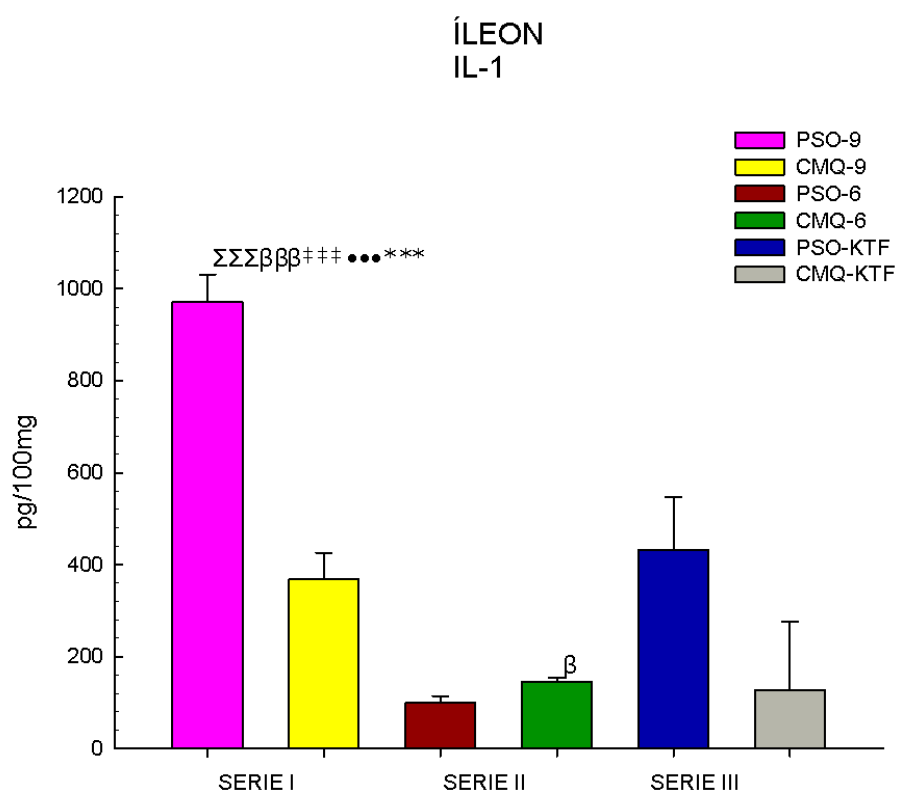


Figura 90: Niveles tisulares de interleuquina 1beta (IL-1 β) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $...$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

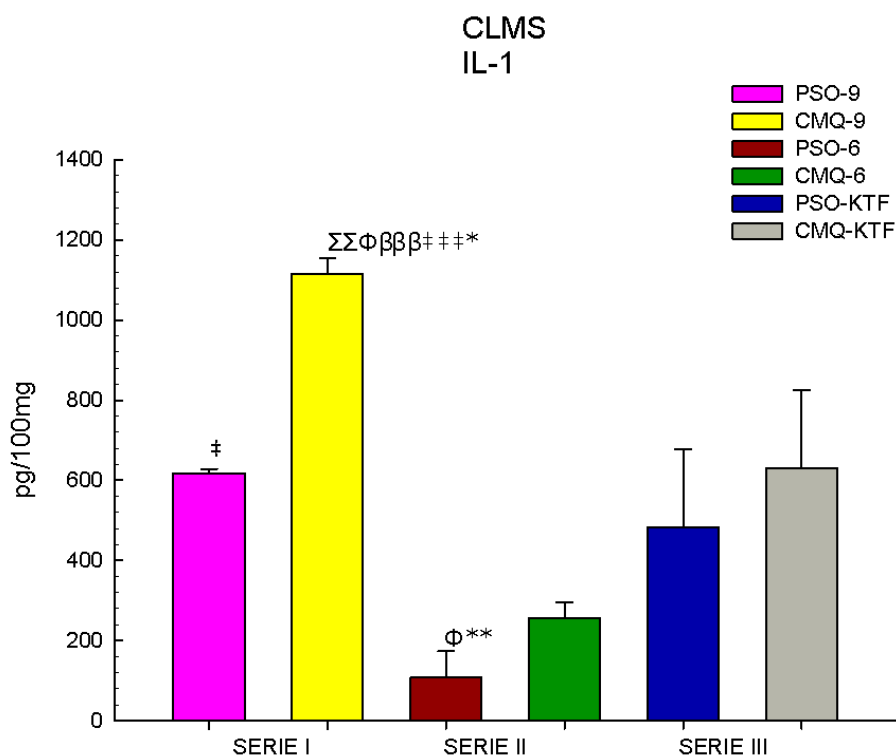


Figura 91: Niveles tisulares de interleuquina 1beta ($IL-1\beta$) en ganglios del mesenterio (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-KTF; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

12.C.2. Niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa

Los niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos disminuyen en las ratas a las que se les practica una colestasis microquirúrgica ($p < 0,001$), pero la administración de ketotifén no modifica las diferencias significativamente (tabla 27; figuras 92, 93 y 94).

Tabla 27: Niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF).

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	4833,83 ^{ΣΣΣβββ+++●●●***} ± 337,63	409,45 ^{Σβ} ± 55,94	38,46 ± 13,89
	CMQ-9 (n = 5)	1613,65 ± 778,99	582,1 ^{ΣΣββ+*} ± 163,07	91,96 ± 3,74
Serie II	PSO-6 (n = 5)	696,57 ± 36,42	110,32 ± 58,34	161,75 ± 22,01
	CMQ-6 (n = 5)	334,33 ± 117,05	208,31 ± 87,61	337,13 ± 73,76
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	2256,32 ^{βββ+++} ± 157,36	85,97 ± 20,46	157,66 ± 51,13
	CMQ-KTF (n = 5)	852,35 ± 505,56	299,64 ± 32,59	76,05 ^{ΣΣΣβββΦΦΦ} +++●●● ± 19,34

Media ± desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $+$ $p < 0.05$; $++$ $p < 0.01$; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $*$ $p < 0.05$; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

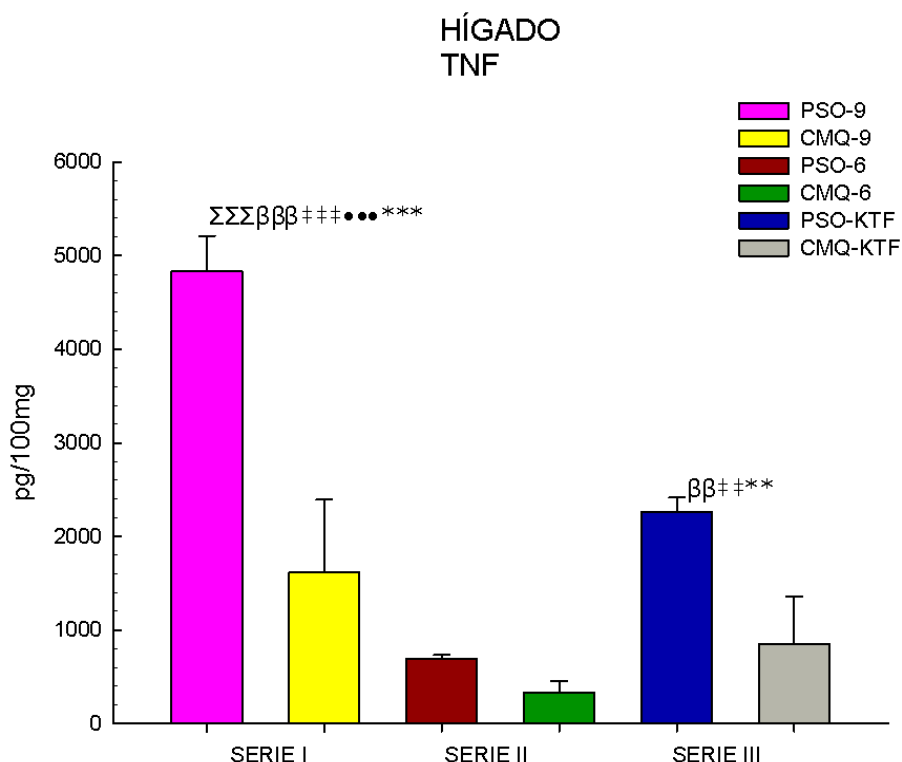


Figura 92: Niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $++$ $p < 0.01$; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

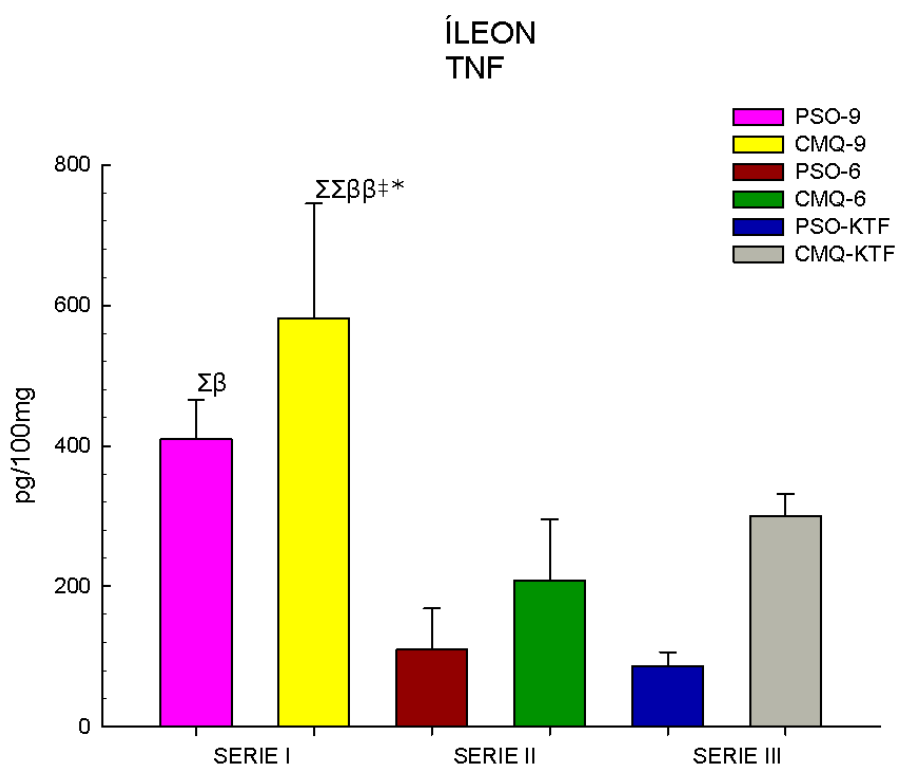


Figura 93: Niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-6; Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-KTF; \pm $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

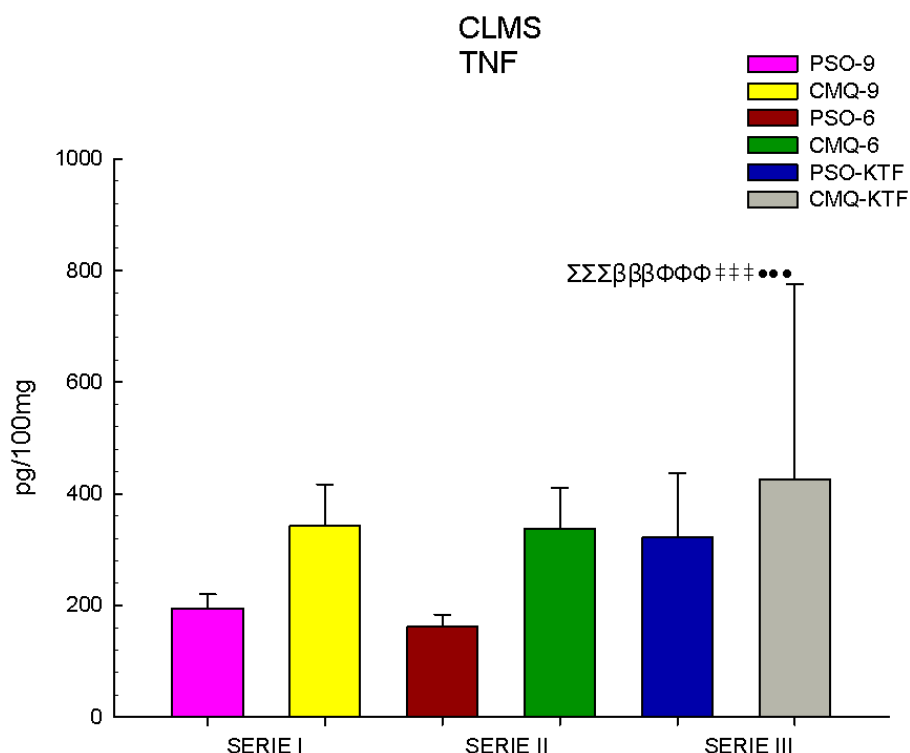


Figura 94: Niveles tisulares de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9.

12.C.3. Niveles tisulares de interleuquina 13 (IL-13)

La concentración de interleuquina 13 encontrada en el hígado de las ratas pseudooperadas es mayor que en las colestásicas ($p < 0,001$) (tabla 28; figuras 95, 96 y 97).

Tabla 28: Niveles tisulares de inteleuquina 13 (IL-13) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	184,62 ^{ΣΣΣ●●***} ± 25,07	37,81 ± 7,73	57,42 ± 13,53
	CMQ-9 (n = 5)	78,61 ± 27,22	49,47 ^Σ ± 21,94	64,98 ± 21,31
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	110,26 ^{●***} ± 28,93	20,19 ± 7,48	40,41 ± 24,85
	CMQ-KTF (n = 5)	37,38 ± 20,38	35,49 ± 23,09	26,19 ± 46,97

Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \bullet $p < 0.05$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

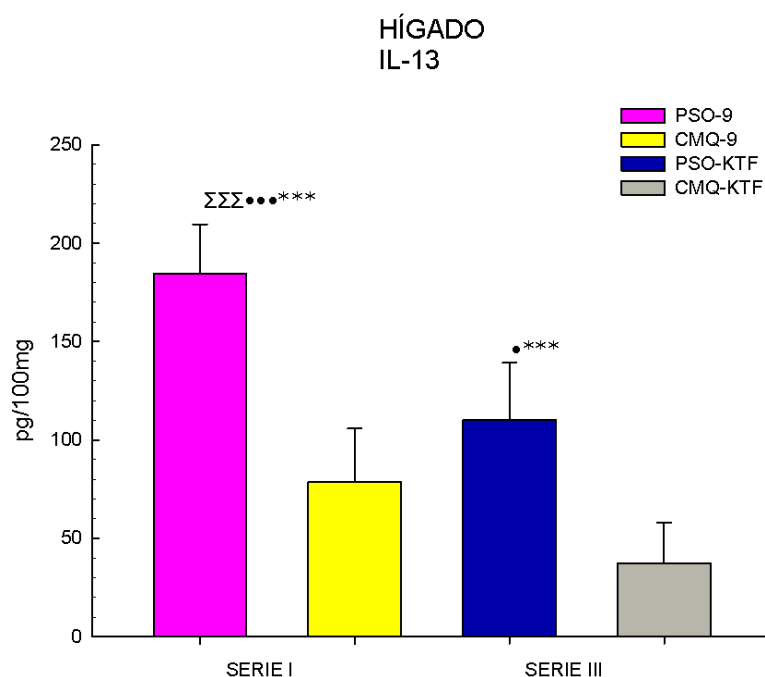


Figura 95: Niveles tisulares de inteleuquina 13 (IL-13) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; • $p < 0.05$; ••• $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

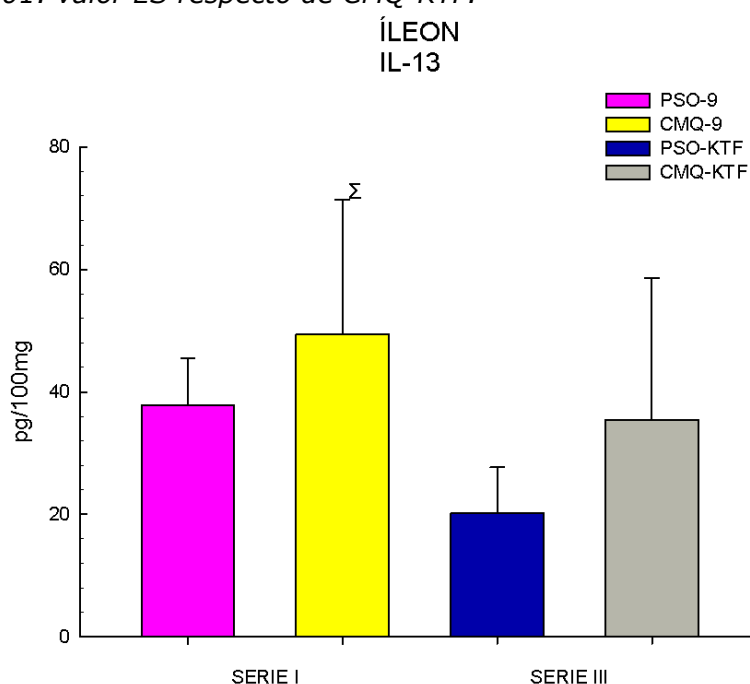


Figura 96: Niveles tisulares de inteleuquina 13 (IL-13) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF.

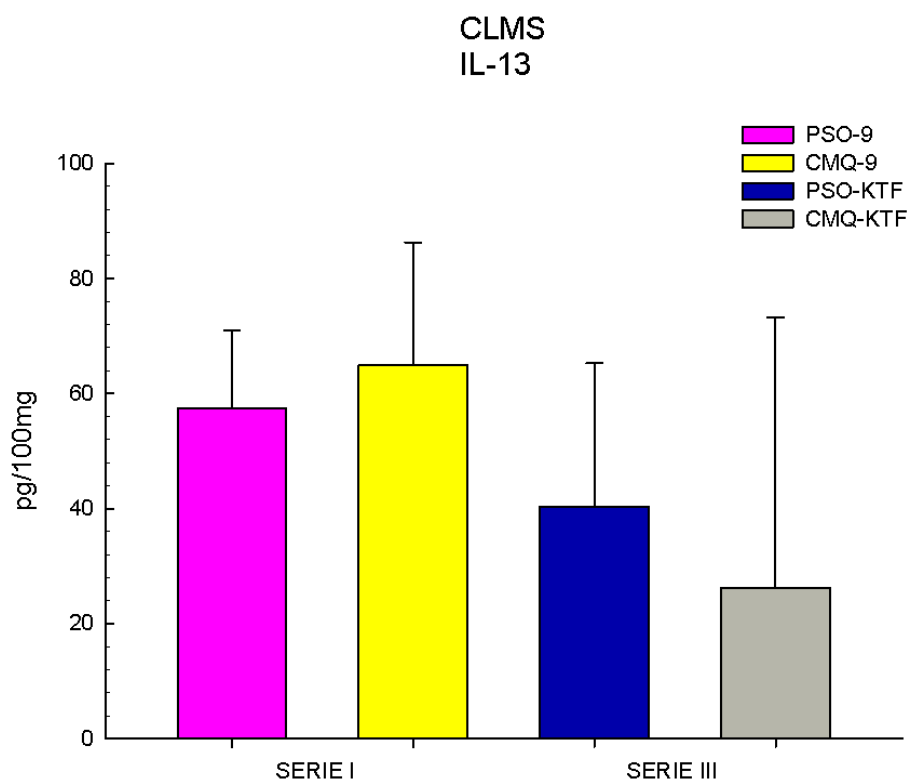


Figura 97: Niveles tisulares de Interleuquina 13 (IL-13) ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

12.C.4. Niveles tisulares de inteleuquina 17A (IL-17A)

En la determinación de interleuquina 17A se encuentra una disminución de sus niveles en hígado en los animales pseudooperados comparados con los que tienen realizada una colestasis microquirúrgica ($p < 0,01$) (tabla 29; figuras 98, 99 y 100).

Tabla 29: Niveles tisulares de inteleuquina 17 (IL-17) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	293,31 ^{$\Sigma\Sigma\bullet\bullet^{***}$} \pm 48,48	41,24 ^{Σ} \pm 6,06	58,33 \pm 47,78
	CMQ-9 (n = 5)	141,79 \pm 99,36	15,97 ^{$\Sigma\Sigma$} \pm 39,11	89,53 \pm 31,67
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	174,14 ^{**} \pm 28,28	25,56 \pm 9,87	50,69 \pm 42,16
	CMQ-KTF (n = 5)	53,44 \pm 26,09	40,78 \pm 28,23	78,84 \pm 77,08

Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

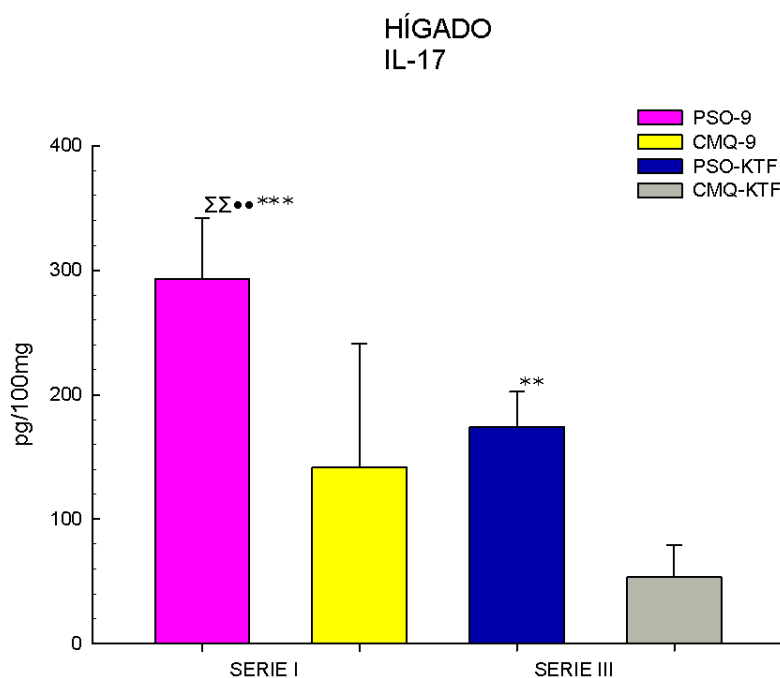


Figura 98: Niveles tisulares de inteleuquina 17 (IL-17) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$: valor ES respecto de CMQ-9; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

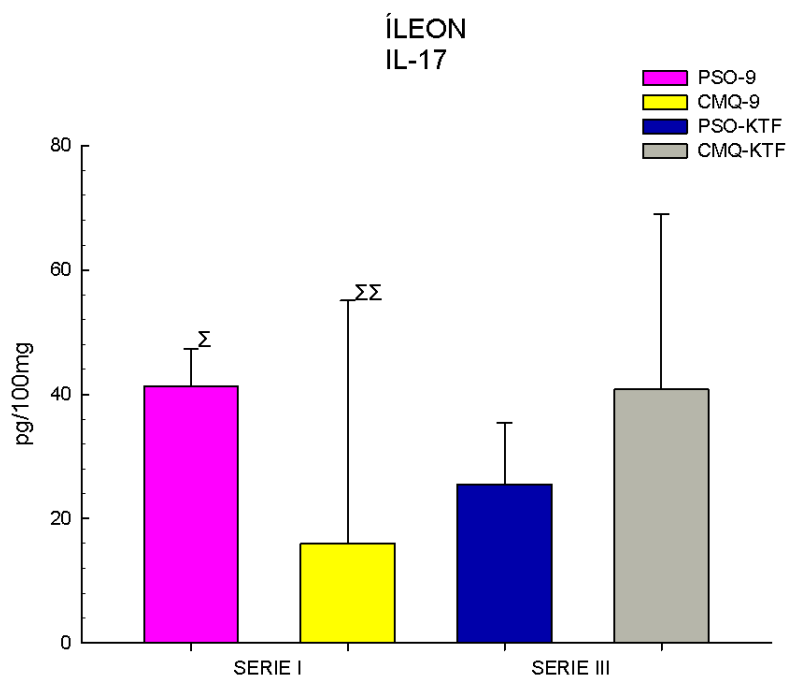


Figura 99: Niveles tisulares de inteleuquina 17 (IL-17) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-KTF.

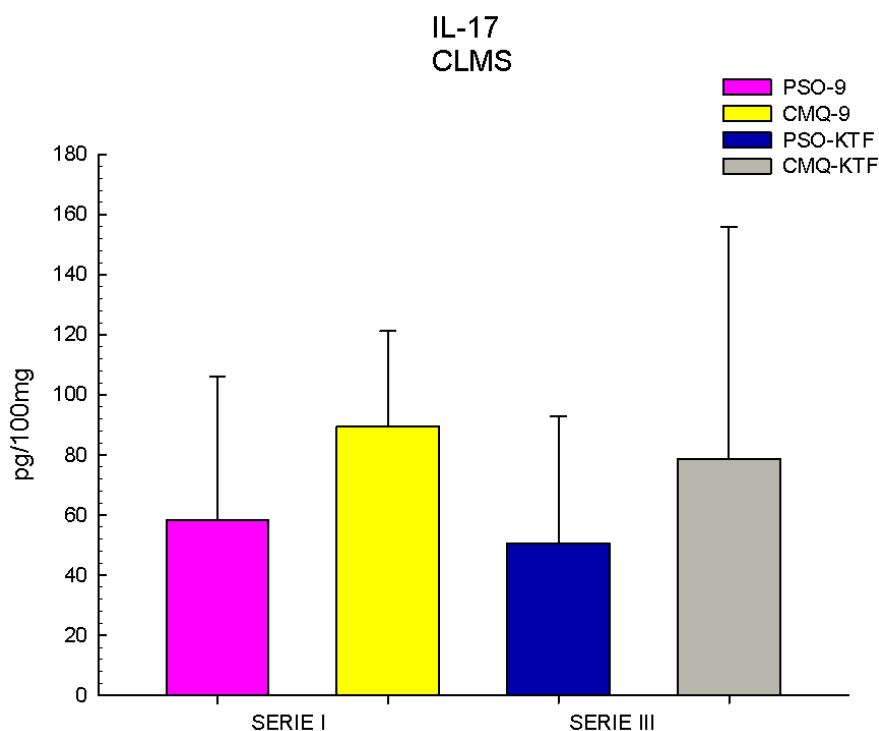


Figura 100: Niveles tisulares de interleuquina 17 (IL-17) en ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

12.D. CITOQUINAS ANTI-INFLAMATORIAS

12.D.1. Niveles tisulares de interleuquina-4

Los niveles de interleuquina 4 en hígado y en íleon son mayores en los animales pseudooperados apreciándose un descenso con la administración de ketotifén ($p < 0,01$). En hígado no se aprecia este comportamiento (tabla 30; figuras 101, 102 y 103).

Tabla 30: Niveles tisulares de interleuquina 4 (IL-4) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	276,24 ^{‡••**} \pm 14,33	56,24 ^{ΣΣΣ**} \pm 10,33	38,46 \pm 13,89
	CMQ-9 (n = 5)	165,23 [*] \pm 36,25	64,22 ^{βΣΣ**} \pm 8,91	91,96 \pm 3,74
Serie II	PSO-6 (n = 5)	455,3 ^{ΦΦΦΣΣΣ+++•••***} \pm 15,45	50,11 ^{ΣΣΣ**} \pm 7	61,29 \pm 40,43
	CMQ-6 (n = 5)	199,89 ^{**} \pm 88,68	79,11 ^{βΦΣΣΣ***} \pm 15,11	216,48 ^{βΦ} \pm 157,8
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	277,77 ^{•**} \pm 11,42	0 \pm 0	157,66 \pm 51,13
	CMQ-KTF (n = 5)	97,22 \pm 25,95	15,52 \pm 18,59	76,05 \pm 19,34

Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \ddagger $p < 0.05$; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; \bullet $p < 0.05$; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $*$ $p < 0.05$; $**$ $p < 0.01$; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

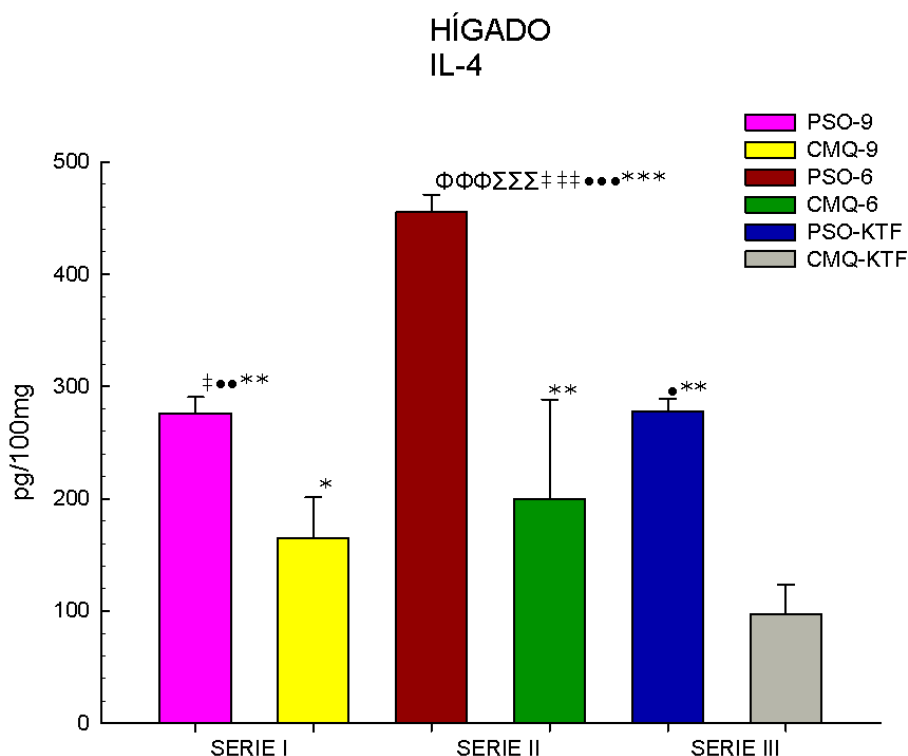


Figura 101: Niveles tisulares de interleuquina 4 (IL-4) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; \dagger $p < 0.05$; $\dagger\dagger\dagger$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; \bullet $p < 0.05$; $\bullet\bullet$ $p < 0.01$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

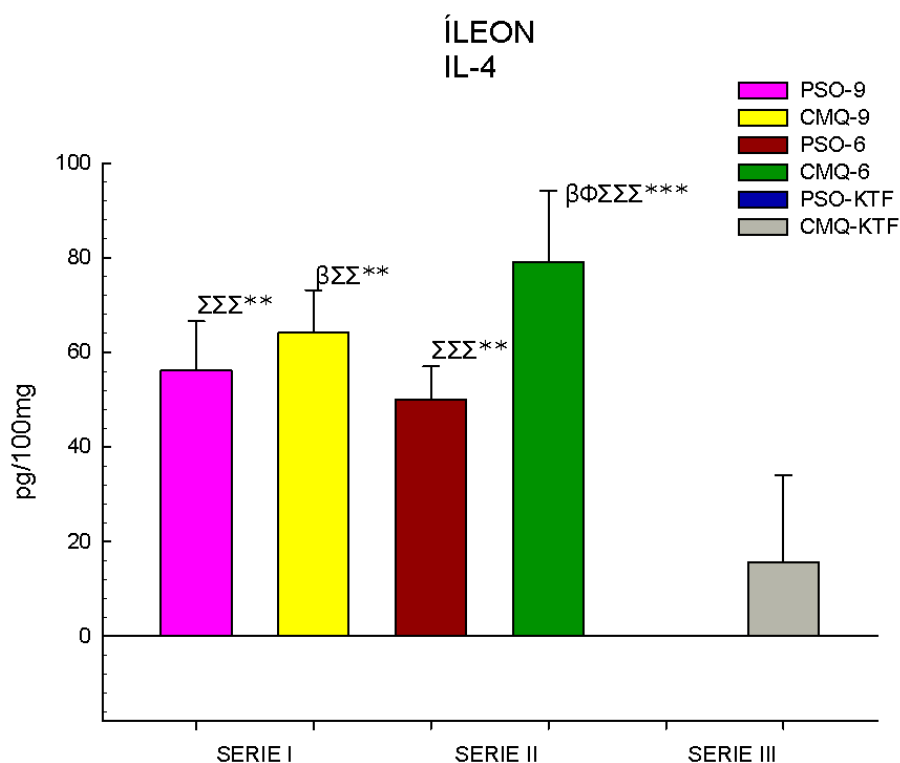


Figura 102: Niveles tisulares de interleuquina 4 (IL-4) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

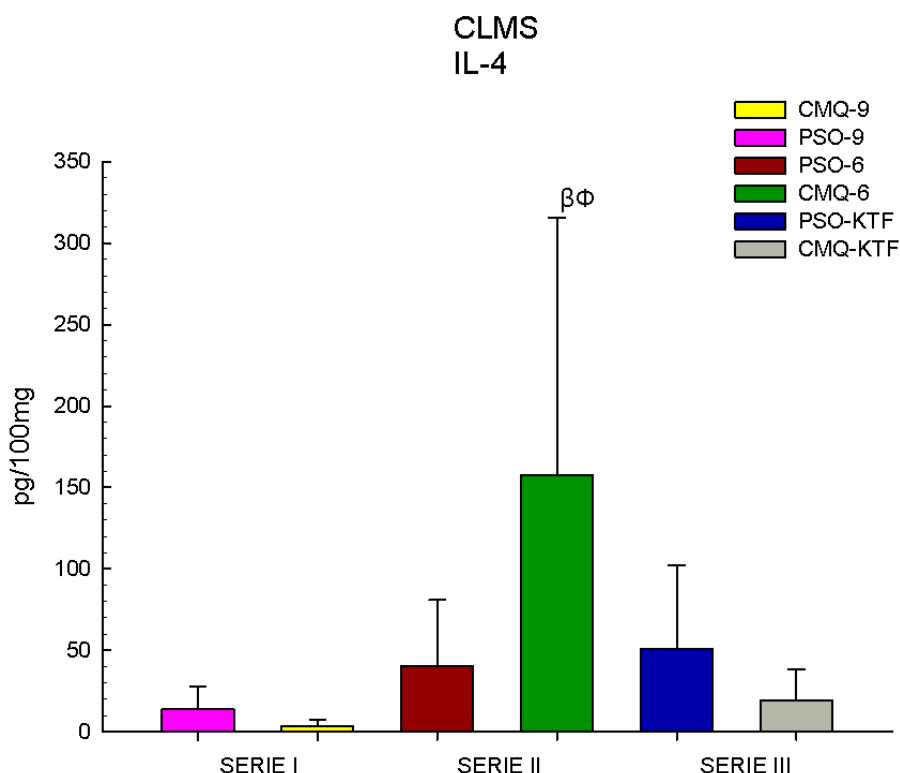


Figura 103: Niveles tisulares de interleuquina 4 (IL-4) en ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9.

12.D.2. Niveles tisulares de Interleuquina 10 (IL-10)

Los animales a los que se realizó colestasis microquirúrgica (CMQ) tienen una concentración de interleuquina 10 menor en el hígado, y mayor en el íleon respecto de las ratas del grupo pseudo-operado (PSO) ($p < 0,001$) (tabla 31; figuras 104 y 105).

Tabla 31: Niveles tisulares de interleuquina 10 (IL-10) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	1270,32 ^{$\beta\beta\Sigma++\bullet\bullet\bullet$} \pm 53,35	221,96 \pm 38,08	
	CMQ-9 (n = 5)	682,53 ^{$\beta\beta++\dagger$} \pm 122,6	318,66 ^{$\Phi\beta\beta\beta\dagger$} \pm 51,67	
Serie II	PSO-6 (n = 5)	336,27 \pm 30,41	108,4 \pm 6,78	144,5 \pm 7,47
	CMQ-6 (n = 5)	197,2 \pm 43,66	173,69 \pm 44,25	231,74 \pm 28,89
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	1008,97 ^{$\beta\beta\beta++\bullet\bullet\bullet$} \pm 69,44	194,24 ^{β} \pm 12,02	
	CMQ-KTF (n = 5)	506,57 ^{\dagger} \pm 161,55	273,88 ^{$\beta\beta$} \pm 53,75	

Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; \dagger $p < 0.05$; $++\dagger$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; \bullet $p < 0.05$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

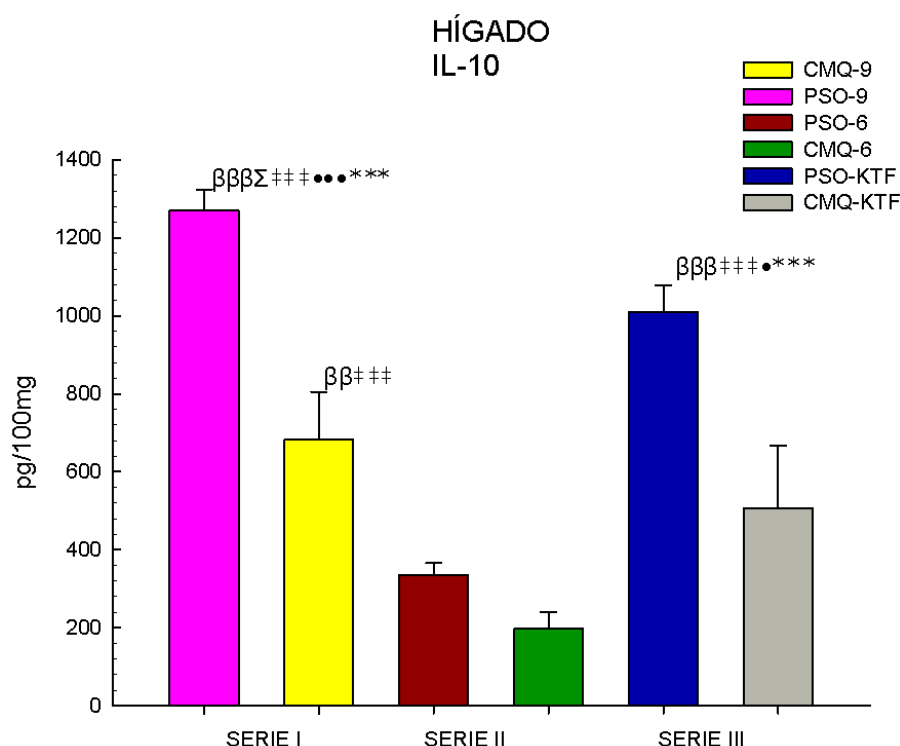


Figura 104: Niveles tisulares de interleuquina 10 (IL-10) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; $+++$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-6; \bullet $p < 0.05$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; $***$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

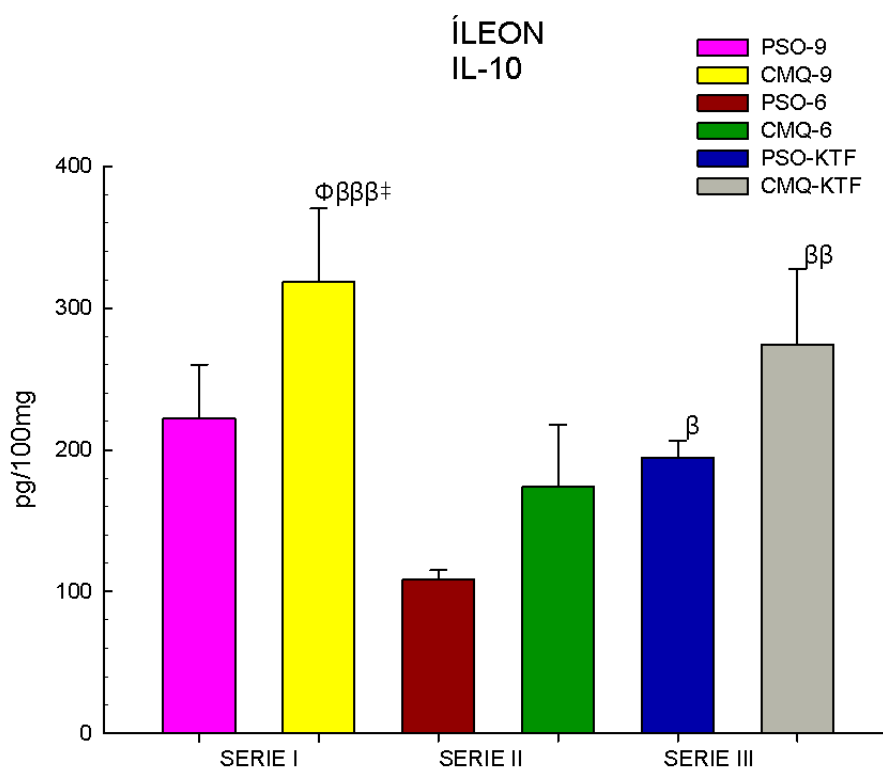


Figura 105: Niveles tisulares de inteleuquina 10 (IL-10) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9); en la **Serie II**, de ratas sacrificadas a las 6 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-6), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-6); y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. β $p < 0.05$; $\beta\beta$ $p < 0.01$; $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-6; Φ $p < 0.05$; valor ES respecto de PSO-9; \pm $p < 0.05$.

13. CONCENTRACIONES TISULARES DE FACTORES DE CRECIMIENTO

13.A. Niveles tisulares de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)

Los niveles en hígado, íleon y ganglios del mesenterio de factor de crecimiento de endotelio vascular se encuentran disminuidos en las ratas con colestasis. Estas diferencias se acentúan con la administración de ketotifén, haciendo incluso que lleguen a ser indetectables en los ganglios ($p < 0,001$) (tabla 32; figuras 106, 107 y 108).

Tabla 32: Niveles tisulares de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	845,63 ^{ΣΣΣ●●●***} \pm 29,54	120,33 ^{ΣΣ**} \pm 43,94	120,89 \pm 119,3
	CMQ-9 (n = 5)	294,19 \pm 137,66	180,15 ^{ΣΣΣ***} \pm 89,61	206,41 ^{Σ*} \pm 76,92
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	363,2 \pm 90,1	17,73 \pm 26,72	5,93 \pm 87,93
	CMQ-KTF (n = 5)	29,18 ^{ΣΣΣ●●●} \pm 102,01	15,41 \pm 55,37	0 \pm 0

Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; ●●● $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

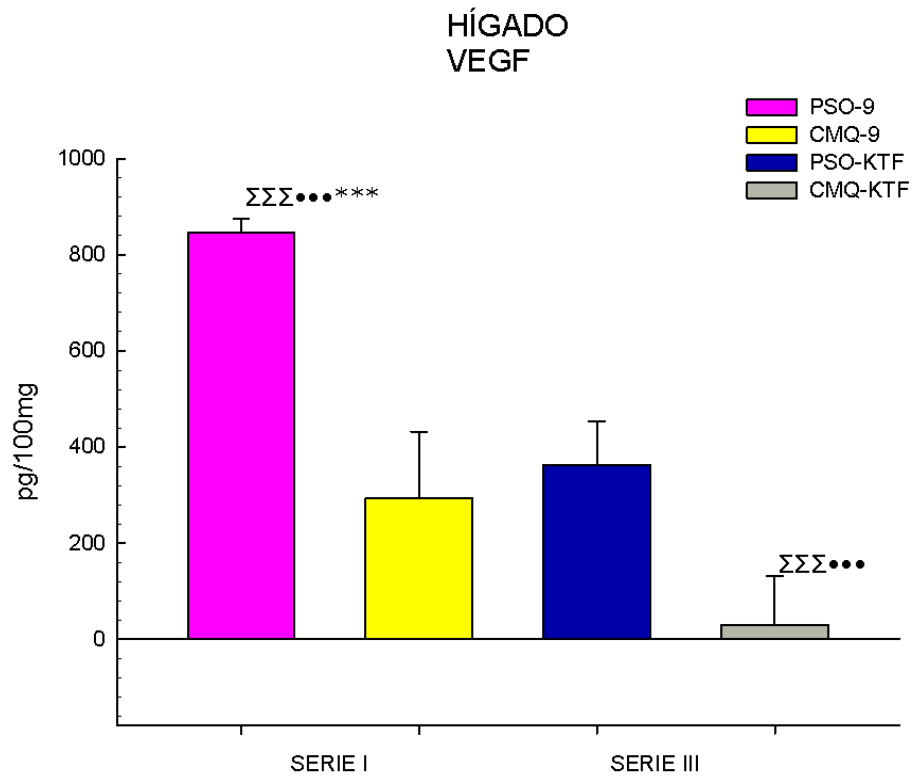


Figura 106: Niveles tisulares de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en hígado (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$; $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-9; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

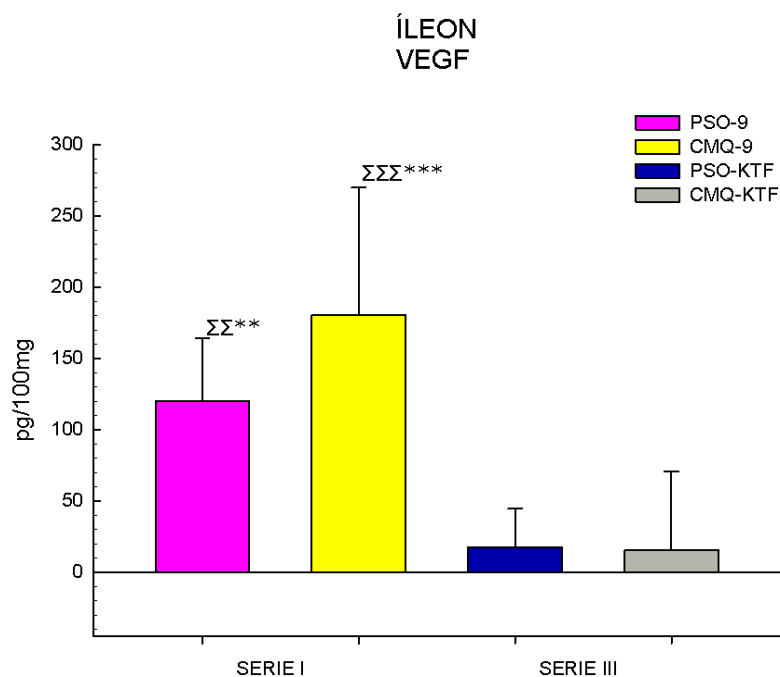


Figura 107: Niveles tisulares de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en íleon (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Sigma\Sigma$ $p < 0.01$; $\Sigma\Sigma\Sigma$ $p < 0.001$: valor ES respecto de PSO-KTF; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

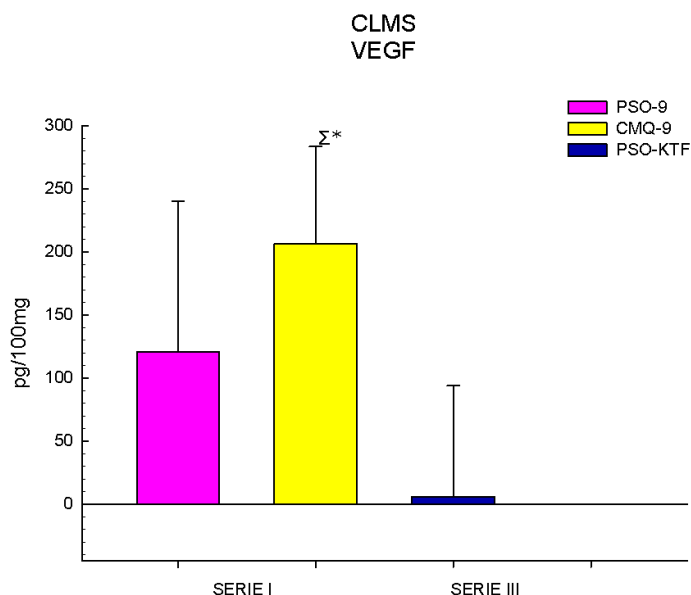


Figura 108: Niveles tisulares de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; * $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-KTF.

13.B. Niveles tisulares de factor de crecimiento transformador beta 1 (TGF β -1)

El factor de crecimiento transformador beta-1 se encuentra disminuido en el hígado y en el íleon de las ratas con colestasis a las que se les ha administrado ketotifén ($p < 0,05$), pero no se aprecian diferencias significativas en los ganglios del mesenterio (tabla 33; Figuras 109, 110 y 111).

Tabla 33: Niveles tisulares de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF β) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

Serie	Grupo	HÍGADO (pg/100mg)	ÍLEON (pg/100mg)	CLMS (pg/100mg)
Serie I	PSO-9 (n = 5)	5,96 \pm 0,76	4,92 \pm 0,46	2,88 \pm 0,28
	CMQ-9 (n = 5)	4,04 \pm 0,71	5,91 \pm 1,6	4,12 \pm 0,37
Serie III	PSO-KTF (n = 5)	4,72 \pm 0,33	2,68 \pm 0,27	3,13 \pm 0,46
	CMQ-KTF (n = 5)	2,84 ^{$\Phi\Sigma\bullet$} \pm 0,25	3,24 ^{$\Phi\Phi\Sigma$} \pm 0,17	3,91 \pm 0,41

Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$; $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; \bullet $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-9.

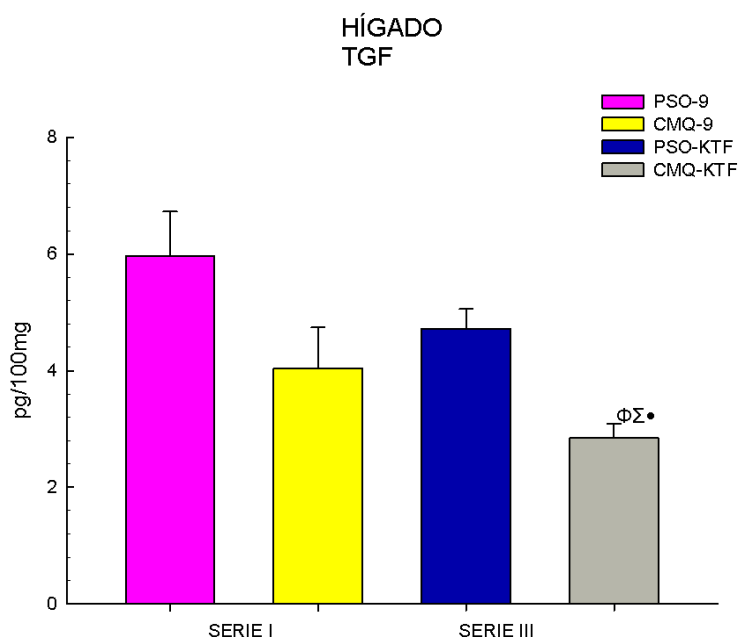


Figura 109: Niveles tisulares de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF_{β}) en hígado (pg/100mg) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. Φ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF; \bullet $p < 0.05$: valor ES respecto de CMQ-9.

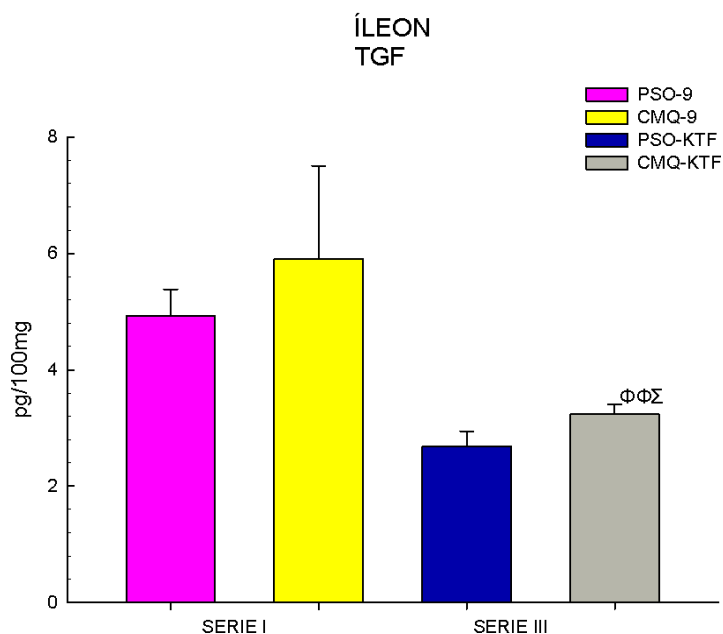


Figura 110: Niveles tisulares de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF_{β}) en íleon (pg/100mg) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar. $\Phi\Phi$ $p < 0.01$: valor ES respecto de PSO-9; Σ $p < 0.05$: valor ES respecto de PSO-KTF.

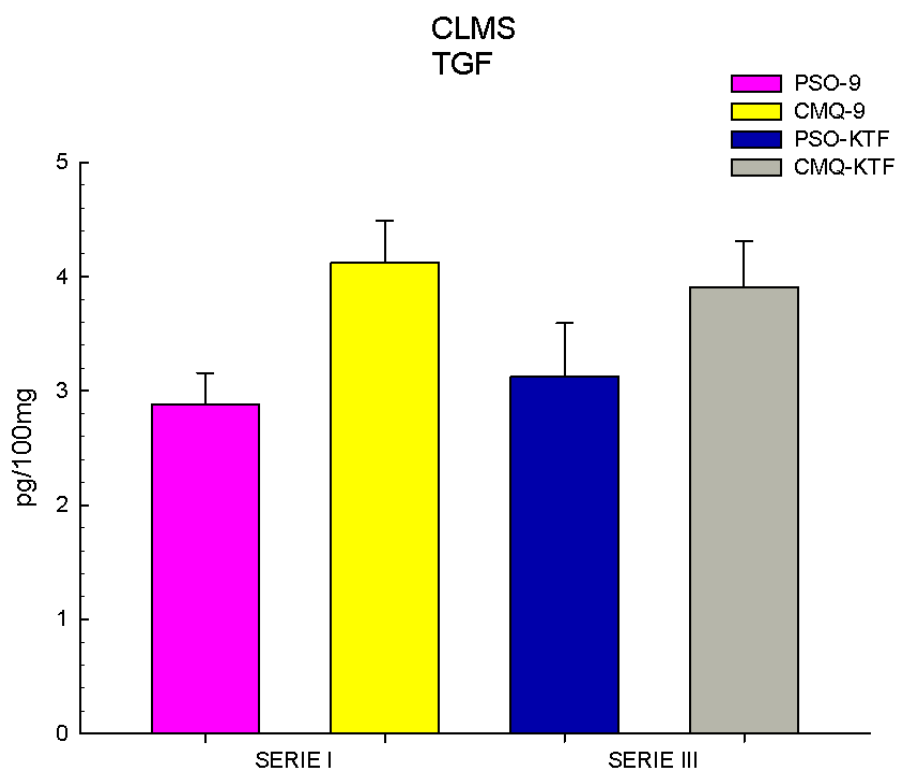


Figura 111: Niveles tisulares de factor de crecimiento transformador beta-1 (TGF_{β}) en ganglios mesentéricos (pg/100mg) en hígado, íleon y ganglios mesentéricos (pg/100mg) en la **Serie I**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o.: pseudo-operadas (PSO-9), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-9) y en la **Serie III**, de ratas sacrificadas entre las 8 y 9 semanas de evolución p.o. tratadas con ketotifén: pseudo-operadas (PSO-KTF), y con colestasis microquirúrgica (CMQ-KTF). Media \pm desviación estándar.

V. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha utilizado un modelo experimental de colestasis que se fundamenta en la resección con técnica microquirúrgica de la vía biliar extrahepática de la rata (Aller y cols., 1993b). Esta técnica microquirúrgica se consideró de elección para el estudio de la colestasis extrahepática, ya que a diferencia de las técnicas macroquirúrgicas, consistentes en la ligadura y sección del colédoco, evita la producción de un pseudoquiste biliar con las subsiguientes complicaciones infecciosas locales (colangitis), regionales (abscesos hepáticos y peritonitis) y sistémicas (abscesos pulmonares, sepsis, shock séptico y muerte) (Aller y cols., 2004a; Aller y cols., 2009a).

La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata se realiza disecando en continuidad el colédoco con los correspondientes conductos biliares que drenan los lóbulos caudado, lateral derecho, medio y lateral izquierdo del hígado. Durante la microdisección se debe evitar la lesión de la arteria hepática propia, así como de sus ramas lobulares y la disección debe ser particularmente cuidadosa cuando se alcanza el extremo craneal de la vía biliar extrahepática. Por último, los conductos lobulares biliares se ligan a ras del parénquima hepático para evitar la persistencia de vía biliar extrahepática residual ya que son el origen de pseudoquistes infectados por gérmenes gram negativos de origen intestinal (Aller y cols., 1993; Aller y cols., 2009a).

El modelo resultante tras la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática en la rata es de insuficiencia hepática progresiva lo que obliga a la administración de vitamina K para evitar la muerte de los animales por hemorragia durante las primeras semanas del post-operatorio (Aller y cols., 2008a; Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2010a; Aller y cols., 2010b). Se consigue así que los animales desarrollen hepatomegalia, asociada a una intensa respuesta proliferativa ductular biliar con apoptosis de hepatocitos y colangiocitos y fibrosis (Sánchez-Patán y cols., 2008; Aller y cols., 2008b).

La respuesta inflamatoria hepática secundaria a la colestasis extrahepática se ha sugerido que posee similitud con la correspondiente a las lesiones traumáticas y en especial a las heridas, ya que cursa con

isquemia, estrés oxidativo y nitrosativo, infiltración leucocitaria, estrés enzimático, angiogénesis y fibrogénesis (Aller y cols., 2008a; Aller y cols., 2010c). Entre los factores etiopatogénicos, destacan la hipertensión intraductular y la estasis de sales biliares. En particular, las sales biliares son potencialmente tóxicas para las células hepáticas y, a elevadas concentraciones, dañan la integridad mitocondrial, produciendo liberación de citocromo C y activación de la apoptosis. Sin embargo, la apoptosis también puede ser iniciada en el retículo endoplásmico. El acumulo de sales biliares podría causar estrés del retículo endoplásmico con liberación de calcio iónico y la subsiguiente activación de las cascadas apoptóticas, tanto en hepatocitos como en colangiocitos (De Buy Wenninger y Beuers, 2010; Aller y cols., 2010c).

En los hígados colestásicos de la rata la proliferación ductular biliar se considera que es un proceso dinámico caracterizado por una continua formación y destrucción de colangiocitos por apoptosis (Glaser y cols., 2010). Ya que los colangiocitos tienen la capacidad de inducir fibrogénesis, se ha sugerido que la fibrosis biliar se podría revertir favoreciendo la fagocitosis de los colangiocitos apoptóticos, por fagocitos profesionales como son los macrófagos (Popov y cols., 2010). Sin embargo, es posible que el proceso de polarización de los macrófagos durante la colestasis implique diversas subpoblaciones. Así en respuesta a $\text{TNF-}\alpha$ e interferón- γ ($\text{IFN-}\gamma$) los macrófagos se pueden polarizar hacia el clásico fenotipo M1 que se caracteriza por la elevada expresión de $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-12 e IL-23 (Wynn, 2011). Sin embargo, los macrófagos también pueden polarizarse hacia el fenotipo alternativo M2a cuando sufren la influencia de IL-4 y IL-13, consideradas citoquinas relacionadas con células Th_2 . Asimismo, fenotipo M2b puede ser inducido por $\text{IL-1}\beta$, en tanto que el fenotipo macrofágico M2c puede derivar del estímulo por IL-10, $\text{TGF-}\beta$ o por glucocorticoides (Butcher y Galkina, 2012). En particular en el hígado colestásico, las células cebadas también podrían ser una fuente potencial de $\text{IL-1}\beta$, IL-4, IL-13 e IL-10, las cuales podrían polarizar a los macrófagos según un fenotipo M2 que, a su vez, causaría entre otras alteraciones, fibrosis. Al contrario que los macrófagos con fenotipo M1, los macrófagos

M2 están implicados en los procesos cicatriciales ya que causan remodelación de la matriz extracelular, esferocitosis y reclutamiento de fibroblastos (Wynn, 2012). En este supuesto el incremento de células esplácnicas en las ratas con hipertensión portal secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica podría ser uno de los factores causantes de fibrosis hepática (Aller y cols., 2010d).

La colestasis extrahepática en la rata podría ser considerada un modelo experimental de fibrosis hepática (Hayashi y Sakai, 2011). Entre los factores que podría favorecer la fibrogénesis en este modelo experimental destacan los opioides endógenos, en particular producidos por los colangiocitos (Glaser y cols., 2010). Entre las funciones que caracterizan el epitelio biliar proliferante en la colestasis extrahepática experimental, destacan las relaciones con la producción de mediadores neuroendocrinos en particular los opioides (Alpini y cols., 1988; Glaser y cols., 2010). La activación de los receptores opioides a su vez produce un incremento de la proliferación de células estrelladas hepáticas con incremento de la producción de colágeno (De Minicis y cols., 2008).

Las reacciones ductulares son aceptadas como el paradigma de la respuesta de diferenciación hepática cuando el hígado sufre patología, en particular colestasis, enfermedades inflamatorias y tumores benignos y malignos. Y es que, la patología inflamatoria hepática induciría un proceso de desdiferenciación mediante el cual se crean estructuras embrionarias (Desmet, 2011). Hans Popper (Popper, 1957) ya estableció cuatro tipos de reacciones ductulares: el Tipo 1 predomina en la obstrucción completa de la vía biliar y representa una de las innumerables interacciones entre células epiteliales biliares, estromales e inflamatorias. Este tipo de reacción ductular resulta de la proliferación de colangiocitos pre-existentes, lo cual produce elongación, ramificación y dilatación de los conductillos biliares (Desmet, 2011). El Tipo 2 se divide en dos subtipos: el Tipo 2A, predominantemente periportal, se ha interpretado como una "metaplasia ductular de hepatocitos" y es más frecuente, aunque no exclusiva de las patologías colestásicas crónicas. Además, los hepatocitos colestásicos activan a las células estrelladas hepáticas, que adoptan un fenotipo

miofibroblástico, responsable del aumento de la síntesis de tejido conectivo (Desmet, 2011)

La reacción ductular precoz (6 a 12h) después de la obstrucción biliar se caracteriza por la dilatación de los conductillos biliares distales, los de más estrecho calibre, dúctulos biliares y el plexo biliar periportal, y esto se asocia al inicio de la transformación de los hepatocitos hacia células de tipo biliar (Azmaiparashvili y cols, 2012). Así, por transdiferenciación de los hepatocitos maduros en células ductulares biliares se forman nuevos conductillos biliares desde el segundo o tercer día, si bien éste fenómeno está completamente establecido a los siete días de la obstrucción (Georgiev y cols., 2008).

Así, a corto plazo (7 días) el modelo de colestasis microquirúrgica experimental desarrolla hepatomegalia con proliferación ductular (reacción ductular Tipo 1) (Desmet, 2011; Aller y cols; 2004a). Sin embargo, a largo plazo (6 a 8 semanas), éste modelo microquirúrgico de colestasis obstructiva desarrolla una intensa proliferación biliar con fibrosis (reacción ductular Tipo 2A), aunque la pérdida de la arquitectura normal hepática típica de la cirrosis raras veces es encontrada (Sánchez-Patán y cols., 2008; Aller y cols., 2008a; Aller y cols., 2010c)

Las células cebadas residen habitualmente, aunque en escaso número, en los tractos portales hepáticos, sin embargo en las patologías hepáticas crónicas como son la cirrosis biliar primaria y la cirrosis alcohólica, su número aumenta invadiendo no solo los espacios portales, sino también los sinusoides (Farrel y cols., 1995). Incluso en estas enfermedades hepáticas progresivas, el incremento del número de células cebadas se correlaciona con el grado de fibrosis hepática. Por lo tanto, se ha sugerido que las células cebadas y sus mediadores pueden estar implicadas en la fibrogénesis hepática (Farrell y cols., 1995; Francis y Meininger, 2010). Experimentalmente, en un modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata también se ha demostrado que las células

cebadas se acumulan en los espacios portales y alrededor de los conductos biliares proliferantes (Takeshita y Shibayama, 2005).

Histamina es un mediador almacenado en las células cebadas residentes en los tejidos y desempeña importantes funciones en las distintas fases de la respuesta inflamatoria asociadas al proceso de curación de las heridas y, por tanto, a la fibrosis (Kupietzky y Levi-Schaffer, 1996). Histamina es un estimulante de la migración de fibroblastos y, por lo tanto, puede contribuir a la producción de fibrosis (Kohyama y cols, 2009). A su vez, la inhibición de las células cebadas por ketotifén, al reducir la concentración de histamina tisular podría inhibir la migración hepática de fibroblastos, así como su estimulación para la producción de colágeno, por lo que sería un mecanismo eficaz para revertir la fibrosis hepática (Garbuzenko y cols., 2002).

Asimismo, las lesiones hepáticas son un factor fundamental en la inducción de transición epitelio-mesenquimal (Choi y Diehl, 2009). Tres tipos de células hepáticas se ha demostrado que pueden experimentar dicha transición, como son los hepatocitos, los colangiocitos y las células estrelladas hepáticas. En particular los colangiocitos pueden sufrir una completa transición epitelio-mesenquimal induciendo la expresión de genes mesenquimales y adquiriendo un fenotipo migratorio (Deng Y-H y cols., 2011). Asimismo, colangiocitos de ratas con fibrosis biliar co-expresan marcadores epiteliales y mesenquimales, una característica propia de la transición epitelio-mesenquimal (Omenetti y cols, 2008; Choi y Diehl, 2009). Por lo tanto, se ha concluido que la atresia biliar y en general las hepatopatías asociadas a proliferación ductular, cursan con transición epitelio-mesenquimal, no solo producida por hepatocitos, sino también por colangiocitos (Díaz y cols., 2008; Choi y Diehl, 2009).

En la actualidad, uno de los objetivos fundamentales en investigación hepática es la reversibilidad de la fibrosis causante de hipertensión portal. Hasta fechas recientes se considera que la fibrosis del hígado era irreversible y la única posibilidad terapéutica consistía en el control de los factores exógenos y endógenos (Ismail y Pinzani, 2011). Sin embargo, el

descubrimiento de la actividad de los distintos subtipos de macrófagos en la producción y resolución de la fibrosis ha modificado las expectativas terapéuticas respecto de esta patología. Así, la interacción entre el sistema de quimioquinas y los macrófagos en procesos que causan la resolución de la fibrosis es objeto de investigación con el objeto de obtener terapias eficaces (Desmet y Roskams, 2004; Mitchell y cols., 2009).

Los modelos animales han sido muy útiles en el estudio de la fisiopatología de la fibrosis y cirrosis hepáticas (Tsukamoto y cols., 1990; Iredale, 2007). Aunque en la actualidad no existe un modelo experimental que reproduzca exactamente el proceso de fibrosis hepática en el ser humano (Iredale, 2007), el estudio de modelos de fibrosis hepática en animales y en particular en la rata, son fundamentales para el ensayo de nuevas terapias antifibrogénicas (Hoefs y cols., 2011). Por esta razón, el modelo de fibrosis por colestasis extrahepática microquirúrgica se ha utilizado en el presente trabajo. Este modelo experimental ha permitido demostrar el efecto beneficioso de ketotifén en el tratamiento de la fibrosis hepática y, por lo tanto, la implicación en su producción de las células cebadas esplácnicas.

Ketotifén (4-(1-metil-4-piperidiliden) 4H-benzo [4,5] ciclohepta [1,2-b] tiofen-10 (9H)-hidrogeno fumarato), es un antagonista de receptor H_1 de histamina con propiedades estabilizadoras de células cebadas (Sakamoto y cols., 2012). Aunque los mecanismos íntimos de la estabilización de células cebadas por ketotifén se desconocen, se ha demostrado que el bloqueo que produce de los canales de calcio es esencial para evitar la degranulación de las células cebadas. Sin calcio intracelular las vesículas secretoras no pueden fusionarse con la membrana celular y, por lo tanto, las células cebadas no pueden degranular sus factores proinflamatorios (Spataro y Bossman, 1976; White y cols., 1984). A su vez, en el hígado colestásico ketotifén, además de reducir la liberación de mediadores inflamatorios podría también inhibir la liberación extracelular de HMGB₁ (*High mobility group box 1*) por células apoptóticas (Ramos y cols., 2010). La colestasis extrahepática microquirúrgica es causante de apoptosis hepatocitaria, asociada a la proliferación ductular biliar y al acúmulo de células cebadas

alrededor de los conductos biliares proliferantes (Aller y cols., 2008b). A su vez, se ha descrito que en las reacciones ductulares biliares a la agresión, macrófagos derivados de la medula ósea son capaces de fagocitar los hepatocitos tanto apoptóticos como necrosados, estimulando el excesivo acúmulo de miofibroblastos con progresiva producción de matriz extracelular, disregulación de las células endoteliales hepáticas con remodelación vascular que causa fibrosis, hipertensión venosa portal y ascitis (Boulter y cols., 2012; Diehl, 2012). Por esta razón, la disminución de la fibrosis hepática en las ratas colestásicas tratadas con ketotifén podría ser atribuida tanto a la acción estabilizadora de células cebadas (Sakamoto y cols., 2012) como a su acción inhibidora de la liberación de HMGB₁ por células apoptóticas. En este sentido, mediadores nucleares, incluyendo DNA se consideran altamente proinflamatorios y su liberación extracelular durante la apoptosis puede ser causante de inflamación hepática (Konstantinidis y Kitsis, 2012). Sin embargo, es de particular interés respecto de los resultados del presente trabajo experimental el efecto beneficioso de ketotifén a pesar de ser administrado durante un estadio evolutivo tardío de la colestasis extrahepática experimental. Esta acción de ketotifén implica la posibilidad de lograr la reversibilidad de la fibrosis hepática mediante la inhibición de la actividad de las células cebadas.

Otro importante mecanismo antiinflamatorio de ketotifén se fundamenta en su capacidad para regular la actividad metabólica de los fagocitos. Así, como la mayoría de los antihistamínicos-H₁, ketotifén inhibe el metabolismo de los macrófagos durante la respuesta inflamatoria, que se considera dependiente de mieloperoxidasa. El resultado es la modulación en la liberación de mediadores inflamatorios como óxido nítrico (NO) y radicales libres de oxígeno (Lojek y cols., 2011). En otros procesos inflamatorios crónicos la estabilización de células cebadas también ha demostrado que influye tanto en el gasto energético como en la apoptosis y en la angiogénesis. Esta polifacética actividad de ketotifén, ha permitido su utilización con éxito en el tratamiento de alteraciones metabólicas crónicas como por ejemplo la obesidad y la diabetes (Wang y Shi, 2011).

La inhibición del funcionalismo fagocitario por ketotifén, sugiere que en los animales colestásicos tratados con este fármaco se reduciría el efecto estimulante de los miofibroblastos por macrófagos, con disminución de la producción de IL-6 y de colágeno, disminución de la transdiferenciación de fibroblastos en miofibroblastos y, por último, reducción de la fibrogénesis hepática, disminución de la resistencia al flujo portal y menor intensidad de hipertensión en el territorio esplácnico (Ma y cols., 2012). Entre los mediadores de células cebadas y macrófagos implicados en la estimulación de los fibroblastos destaca TGF- β (Monument y cols, 2012). Ya que TGF- β aumenta en los hígados colestásicos, alcanzando significativas concentraciones, su disminución causada por el tratamiento con ketotifén constituiría uno de los mecanismos antifibrogénicos de este fármaco (Monument y cols., 2010).

En estudios previos hemos comprobado que la acción de ketotifén sobre la actividad fibrogénica hepática es dosis-dependiente. Por esta razón, los animales con menor ingesta del fármaco no presentaban disminución de la fibrosis hepática. Sin embargo, la disminución de la presión portal tras la administración tan solo temporal de ketotifén sugiere que al disminuir la resistencia hepática al flujo portal, bien por disminución de la intensidad de la respuesta inflamatoria y, por tanto de los mecanismos implicados en la fibrogénesis, o por reducción de la actividad proliferativa biliar y angiogénica se favorecería no solo la circulación esplácnica sino también la función hepática. En este supuesto, ketotifén actuaría por un doble mecanismo de acción para disminuir las complicaciones propias de la colestasis extrahepática, esto es disminuyendo el grado de insuficiencia hepática e inhibiendo la respuesta inflamatoria esplácnica, En esencia, la acción terapéutica de ketotifén, exige una adecuada estabilización de la membrana celular de las células cebadas, evitando tanto la degranulación vesicular como la intercomunicación con células vecinas, como son fibroblastos, células dendríticas y linfocitos T, que en su conjunto participan en la patogenia de la fibrosis hepática (Ambrust y cols, 1997; Foley y cols., 2011; Carroll-Portillo y cols., 2012).

Otras consecuencias patológicas de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata son la producción de circulación colateral porto-sistémica secundaria a la hipertensión portal, así como la ascitis (Aller y cols., 2004b). Se ha propuesto que la hipertensión portal induce una respuesta inflamatoria de origen esplácnico y con repercusión sistémica que sería de interés caracterizar, principalmente por sus implicaciones terapéuticas (Aller y cols., 2007). En la rata, se podría considerar que durante la evolución de la hipertensión portal cambian los mecanismos que la producen. Así, en fases precoces la hipertensión portal se atribuye el aumento de la resistencia al flujo sanguíneo portal, pero cuando se desarrolla la circulación colateral porto-sistémica, el mantenimiento de la hipertensión portal se atribuye al incremento del flujo sanguíneo arterial mesentérico (Vorobioff y cols., 1983; Vorobioff y cols., 1984; Sikuler y cols., 1985; Sikuler y Groszmann, 1986).

En esencia, la hipertensión portal cursa con circulación hiperdinámica esplácnica y sistémica de naturaleza multifactorial (Kroeger y Goszmann, 1985a; Bosch y cols., 1992; Iwakiri y Groszmann, 2006). En las ratas, con hipertensión portal prehepática la circulación hiperdinámica se atribuye a dos mecanismos: 1) El incremento de mediadores vasodilatadores, como son óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), TNF- α , glucagón, prostaciclina (PGI₂), endocannabinoides, adrenomedulina y sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Iwakiri y Groszmann, 2006). 2) La anómala respuesta a mediadores vasoconstrictores ya endógenos como noradrenalina, endotelina y vasopresina, o bien exógenos como fármacos alfa-agonistas (Bomzon y Blendis, 1987; Blanco-Rivero y cols., 2009; Sastre y cols., 2012).

En el modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata la hipertensión portal se asocia también con gran desarrollo de la circulación colateral porto-sistémica, principalmente de tipo esplenorenal, así como ascitis a corto plazo. Aunque se ha sugerido que el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica se debe a la apertura de vasos preexistentes, en la actualidad se considera que es un proceso de neoangiogénesis mediado principalmente por el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Fernández y cols., 2005). En este sentido, la disminución esplácnica de

VEGF por ketotifén en las ratas colestásicas implicaría que este fármaco actuaría como inhibidor de la respuesta tisular a la hipoxia. En la actualidad, se considera que la respuesta inicial a la hipoxia implica la estabilización del factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF) 1-alfa, cuyas acciones son las de favorecer la instauración de un metabolismo anaerobio, con glucólisis anaerobia, hipometabolismo y angiogénesis (Wong y cols., 2012). Por lo tanto, al disminuir la concentración esplácnica de VEGF ketotifén podría reducir el grado de hipoxia tisular en la hipertensión portal colestásica y en consecuencia inhibir uno de los más importantes factores productores de inflamación.

En la hipertensión portal el flujo linfático esplácnico también podría influenciar su evolución. En particular, el tracto gastrointestinal sufre edema en la hipertensión portal, favoreciendo así el incremento del flujo linfático e, incluso causando dilatación de los vasos linfáticos (Ikeda y cols., 2001). Es posible que esta dilatación vascular linfática se produzca tanto por el excesivo drenaje de líquido intersticial, como por la estasis linfática inducida por la acción de mediadores inflamatorios liberados por las células cebadas sobre el endotelio linfático. Asimismo, estos mediadores podrían inhibir la actividad contráctil propulsora de la linfa. En este supuesto, tanto el edema intersticial como la dilatación vascular linfática podrían influenciar la evolución de la hipertensión portal, tanto en el ámbito esplácnico como sistémico (Aller y cols., 2007a; Aller y cols., 2010e).

También las células cebadas han sido implicadas en la producción de traslocación bacteriana intestinal en las ratas con hipertensión portal (Llamas y cols., 2009). Se ha demostrado que a los 30 días de evolución, la hipertensión portal prehepática causa traslocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos (Llamas y cols., 2010). Entre los factores intestinales que podrían estar implicados en la producción de traslocación bacteriana destacan la disbacteriosis y el aumento de permeabilidad intestinal (Wiest y Rath, 2003; García-Tsao y cols., 1993). Se ha sugerido que en la hipertensión portal experimental podría existir un eje inflamatorio hepato-intestinal, con producción hepática de mediadores pro-inflamatorios, como son TNF- α , IL-1 β y NO, en tanto que en el tracto gastrointestinal se

produce un incremento de IL-10, una citoquina con poderosa acción antiinflamatoria, y también mediadora de la respuesta por células Th2 (Aller y cols., 2005; Palma y cols., 2005). Por esta razón, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica asociada a la hipertensión portal podría estar implicada en la producción de traslocación bacteriana intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos (Llamas y cols., 2010). Sin embargo, en la actualidad la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos Th2 se considera que es heterogénea, esto es dependiendo de la combinación de los mediadores liberados puede ser pro-inflamatoria, proliferativa o bien anti-inflamatoria. Por esta razón, los citados resultados deberían ser reevaluados a la luz de nuevas investigaciones en las que se determine un mayor número de los mediadores sintetizados y liberados por las células cebadas para así evaluar con precisión las características específicas de este tipo de respuesta inflamatoria secundaria a hipertensión portal colestásica.

La hipertensión portal causa una respuesta inflamatoria tanto esplácnica como sistémica, con implicación de las células cebadas en su etiopatogenia (Aller y cols., 2007a; Aller y cols., 2007b). Entre los procesos inflamatorios en los que se ha demostrado la participación de las células cebadas, destacan las enfermedades autoinmunes, como son la esclerosis múltiple, la dermatitis atópica, la psoriasis y la artritis reumatoide (Theoharides y cols., 2012). Sin embargo, otros procesos inflamatorios como son los post-traumáticos e infecciosos también se desarrollan con participación de las células cebadas (Galli y Tsai, 2008; Moon y cols., 2010; Galli y cols., 2011). En la hipertensión portal las células cebadas, por su interacción bidireccional con las neuronas en el tracto gastrointestinal (Van Nassauw y cols., 2007), pueden ser activadas por múltiples factores neuronales, entre los que se incluyen los neurotransmisores (Bischoff, 2009; Moon y cols., 2010; de Jonge, 2011; Van Diest y cols., 2012; De Winter y cols., 2012). Sin embargo, se debe considerar también que estas células, aunque inflamatorias en determinadas circunstancias, también poseen acción antiinflamatoria, favorecen la tolerancia, inducen la resolución de la inflamación y participan en el mantenimiento de la homeostasis tisular y orgánica (Lu y cols., 2006; Galli y Tsai, 2008; de Vries

y Noelle, 2010). Por lo tanto, en el intestino aunque poseen actividad inflamatoria, debido a su heterogeneidad funcional, también constituyen una defensa antimicrobiana, y están implicadas en el control de la función de la barrera intestinal (Bischoff, 2009).

En respuesta a la hipertensión portal las células cebadas intestinales podrían producir disfunción de la barrera epitelial, con traslocación bacteriana y alteración de la motilidad intestinal que favorece la disbacteriosis (Snoek y cols., 2012). Con independencia de la estimulación neural de las células cebadas en la hipertensión portal, secundaria a la hiperactividad sistémica simpática (Aller y cols., 2007b), también se ha implicado en la activación de su fenotipo proinflamatorio el estímulo que ejercería la hiperactividad del eje renina-angiotensina-aldosterona (Paizis y cols., 2002). En este sentido, la degranulación de las células cebadas con liberación de proteasas (Caughey, 2011), activaría los receptores de proteasas localizados en las células epiteliales intestinales, e incrementaría la permeabilidad de la barrera intestinal (Moriez y cols., 2007). Por lo tanto, ketotifén, al estabilizar las células cebadas intestinales, reduciría la permeabilidad epitelial y la traslocación bacteriana intestinal y, en consecuencia, inhibiría la respuesta inflamatoria intestinal (Moriez, 2007). Asimismo, se ha descrito que la liberación de histamina y triptasa por las células cebadas intestinales se asocia al correspondiente incremento de estos mediadores inflamatorios en el parénquima pulmonar, lo que sugiere que la activación de las células cebadas intestinales podría estimular migración de células cebadas a los pulmones, así como su posterior estimulación. A su vez, la administración de ketotifén, inhibe la respuesta inflamatoria pulmonar secundaria a la activación de células cebadas intestinales (Huang y cols., 2012). Ketotifén también ha demostrado su eficacia en otros procesos inflamatorios intestinales, como son el síndrome de intestino irritable (Klooker y cols., 2010) y el íleo postoperatorio (The y cols., 2009). En esencia, ketotifén ejercería un efecto indirecto sobre el microbioma intestinal, con la consecuente repercusión metabólica no solo en el tracto gastrointestinal, y por extensión en el parénquima hepático, sino también en el resto del organismo, ya que los productos derivados del

metabolismo bacteriano intestinal en la insuficiencia hepática fibrótica alcanzan por vía linfática la circulación sistémica (Sekirov y cols., 2010; Hakansso and Molin, 2011)

Ya que la respuesta inflamatoria que induce la hipertensión portal en el territorio esplácnico podría estar mediada por células cebadas, el tratamiento con ketotifén reduciría o inhibiría dicha complicación. Este hipotético planteamiento patogénico de la hipertensión portal lo sugiere la experimentación previa utilizando ratas con ligadura parcial de la vena porta o bien ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica (Aller y cols., 2007a; Aller y cols., 2008a). En las ratas con hipertensión portal prehepática, se produce un significativo incremento de células cebadas tanto en el tracto intestinal como en los ganglios linfáticos mesentéricos (Diez-Arias y cols., 2001; Prieto y cols., 2005; Aller y cols., 2007b). En las ratas con hipertensión portal prehepática las células cebadas aumentan en la submucosa del tracto intestinal (Díaz-Arias y cols., 2001; Prieto y cols., 2005). Sin embargo, en la rata existen dos subtipos de células cebadas, las denominadas mucosas (MMCs) y las conectivas (CTMCs), así denominadas por su preferente localización en contacto con mucosas o con el tejido conectivo, esto es, submucosa y peritoneo, respectivamente (Kinet, 2007; Hallgren y Gurish, 2007). Ambos subtipos poseen distintas características funcionales y éstas, a su vez, pueden ser condicionadas por el medio ambiente (Hallgren y Gurish, 2007).

En las ratas con hipertensión portal prehepática el incremento de células cebadas en la submucosa quizá pertenezca al subtipo conectivo (CTMCs) y sus mediadores se ha propuesto que podrían estar implicados en la producción de las alteraciones inflamatorias esplácnicas propias de este modelo experimental (Moquillaza y cols., 2010). El incremento de la densidad intestinal de células cebadas en la colestasis extrahepática experimental podría participar en la regulación de la respuesta inmunológica esplácnica a la hipertensión portal, mediante la síntesis y liberación de múltiples citoquinas (García-Domínguez y cols., 2010). Tras su activación, las células cebadas en el tracto gastrointestinal pueden liberar IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, IL-18, IL-25, TNF α , factor estimulante

de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), péptido quimiotáctico de macrófagos (MCP-1), RANTES (*regulated on activation of normal T cells-expressed and secreted protein*) y eotaxina (Galli, 1990; He, 2004; Aller y cols., 2007b; Galli y cols., 2008; Bischoff, 2009). Esta profusión en la capacidad de síntesis de mediadores pro- y anti-inflamatorios refuerza la hipótesis de la heterogeneidad funcional de las células cebadas.

Sin embargo, durante la evolución de la colestasis experimental se produce una alteración heterogénea de la distribución de citoquinas pro- y anti-inflamatorias esplácnicas. En esencia, aumenta la concentración de TNF- α , IL-1 β e IL-10 en el tracto gastrointestinal y ganglios linfáticos mesentéricos, en tanto se reduce a nivel hepático y no se demuestran concentraciones significativas esplácnicas (García-Domínguez y cols., 2009). Se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica que se desarrolla en la colestasis microquirúrgica experimental, por estar mediada por células cebadas y presentar incremento de las concentraciones esplácnicas de IL-4 e IL-10, podría ser considerada una respuesta de tipo Th2 (García-Domínguez y cols., 2009). En este supuesto, la respuesta inflamatoria esplácnica post-colestasis microquirúrgica experimental estaría mediada predominantemente por citoquinas de tipo Th2 (Ogasawara y cols., 2006). Los hallazgos del presente trabajo experimental, confirman resultados previos y aportan datos que permiten caracterizar mejor dicha respuesta inflamatoria, en particular en el intestino delgado. Así, el incremento ileal de IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, MCP-1 y TGF- β 1 sugieren la existencia de una respuesta inflamatoria que podría estar protagonizada por células cebadas, las cuales ejercerían mediante la liberación de los citados mediadores, el reclutamiento y supervivencia de numerosas células inmunes, entre las que se incluirían granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos. Asimismo, las células cebadas podrían modular el fenotipo y la función de dichas células inflamatorias reclutadas en el intestino (Theoharides y cols., 1982; Sarchio y cols., 2012). En particular, histamina, sintetizada, almacenada y liberada por las células cebadas, podría ejercer una función moduladora de la respuesta inmunológica

intestinal ya que puede cambiar el balance Th1/Th2 mediante su acción en receptores de histamina linfocitarios (Ogasawara y cols., 2006).

En este modelo experimental de colestasis, la ictericia es también un factor importante en tanto que mediador de la respuesta inflamatoria. En particular, la bilirrubina posee numerosas propiedades bioquímicas y biológicas (Vitek y Schawertner, 2007). Bilirrubina ejerce una acción protectora contra el estrés oxidativo (Vitek y Schawertner, 2007), tiene propiedades antiapoptóticas y antimutagénicas (Bulmer y cols., 2007) y por último, es un potente inmunomodulador (Moseley, 1999). En un modelo de endotoxemia en el ratón se ha demostrado que una sola dosis de bilirrubina ejerce efecto antioxidante así como una intensa actividad anti-inflamatoria (Moseley, 1999). Por lo tanto, en el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica no se debe excluir el importante efecto antioxidante e inmunomodulador que realizaría la bilirrubina, máxime en estadios evolutivos tardíos de este modelo experimental de colestasis.

En el intestino de ratas colestásicas, MCP-1, IL-4 e IL-13 liberados por células cebadas, pueden atraer otras células inflamatorias como neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos. A su vez, la liberación de IL-13 puede ser potenciada por la presencia de IL-4, que es capaz de regular el fenotipo de las células cebadas induciendo la producción de citoquinas tipo Th2, entre las cuales se incluye IL-13 e IL-10 (Bischoff, 2009). MCP-1/CCL-2 es una de las quimioquinas mejor estudiadas de las que se expresan por células inflamatorias y del estroma. En la enteropatía hipertensiva portal, las células endoteliales podrían producir MCP-1 contribuyendo así a la atracción de monocitos, neutrófilos y linfocitos y facilitando la diapédesis de éstas células al espacio intersticial intestinal. A su vez, estas células infiltradas en el intersticio producirían mediadores inflamatorios que activarían a las células residentes intestinales y, por lo tanto, iniciarían y facilitarían la progresión de la respuesta inflamatoria en el tracto intestinal (Kolattukudy y Niu, 2012). Por lo tanto, interferir en la interacción entre MCP-1 con CCR2 puede ser un mecanismo beneficioso en la hipertensión portal ya que suprimiría la respuesta inflamatoria intestinal y, por esta razón, sus efectos sistémicos. En otros tipos de inflamación

intestinal, como es la colitis ulcerosa, se ha demostrado también el incremento en la expresión de MCP-1mRNA y de su proteína en macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales de la mucosa inflamada. Por esta razón, se ha propuesto el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal con un inhibidor de la síntesis de MCP-1 (Yadav y cols., 2010).

En la respuesta inflamatoria esplácnica, inducida por la hipertensión portal, la hipoxia puede desempeñar un protagonismo especial ya que podría activar los macrófagos causando la liberación de MCP-1 en la circulación. A su vez, MCP-1 puede inducir la degranulación perivascular de células cebadas. Entre los mediadores liberados por células cebadas las peptidasas causan activación del sistema renina-angiotensina, cuyo producto final es el octapéptido vasoactivo, angiotensina II (Caughey, 2011). Las proteasas son el tipo de proteínas que con mayor abundancia producen las células cebadas. Al liberarse por degranulación, las proteasas de células cebadas, activarían la respuesta inflamatoria, estimularían la producción de angiotensina II y, por último, la liberación de aldosterona con ahorro de agua y sodio. Además la activación del sistema renina-angiotensina, favorece las interacciones adhesivas entre el endotelio vascular y los leucocitos e incrementa la permeabilidad vascular (Chao y cols., 2011). Sin embargo, las proteasas también están implicadas en mecanismos anti-inflamatorios, así como en la resolución de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, la variedad de funciones de las proteasas de células cebadas, exige cautela, en la valoración de su acción patogénica en la respuesta inflamatoria esplácnica secundaria a hipertensión portal (Caughey, 2011).

La disminución de la concentración intestinal de IL-13 en las ratas con colestasis microquirúrgica tratadas con ketotifén se ha considerado un resultado sugerente de la actividad antiinflamatoria de este fármaco. La IL-13 es una citoquina inmunoreguladora secretada por células Th2 activadas y posee funciones similares a IL-4. En este sentido IL-13 puede contribuir a perpetuar la respuesta tipo 2, por varios mecanismos, como por ejemplo induciendo la expresión de quimioquinas que atraen a linfocitos Th2, o produciendo la liberación de adenosina e histamina que, a su vez,

estimularían a células cebadas en la producción de más IL-13. Otros efectos de IL-13 atañen a las células del epitelio intestinal ya que se ha descrito su implicación en la hiperplasia de células caliciformes (Fushiotti, 2011).

En la enteropatía por hipertensión portal, la hipoxia de la mucosa intestinal induce la expresión de factor inducible de hipoxia (HIF)-1 que constituye un factor de alarma para inducir la inflamación, aunque también promueve su resolución (Colgan y Taylor, 2010). La hipoxia inhibe HIF-hidrolasas, inhibiendo a su vez la degradación de HIF-1 y, por tanto, favorece su estabilización (Aragonés y cols., 2008). En la enteropatía hipertensiva portal, se ha sugerido que la redistribución del flujo sanguíneo produciría, mediante un proceso de isquemia-revascularización, aumento de la permeabilidad endotelial y oxidación que causaría edema intersticial (Aller y cols., 2007a). Numerosos mediadores de células cebadas incluyendo IL-4, IL-13, histamina y proteasas neutras podrían participar en la producción de edema parietal intestinal (Galli y cols., 2008). A su vez, ketotifén, al reducir el componente inflamatorio intestinal de tipo 2, mediante la inhibición de la degranulación de células cebadas, favorecería el flujo sanguíneo mucoso intestinal, disminuiría el grado de edema e inhibiría la traslocación bacteriana, contribuyendo así a la disminución de la intensidad de la respuesta inflamatoria tanto esplácnica como sistémica.

Las células cebadas también podrían realizar una función mediadora en la remodelación intestinal secundaria a la insuficiencia hepática crónica colestásica experimental. En esta respuesta remodeladora participaría el parénquima, representado por el epitelio intestinal, y el estroma, constituido por el tejido conectivo y las estructuras vásculo-nerviosas. Respecto del epitelio, se ha demostrado que la hipertensión portal induce la hiperplasia de las células caliciformes productoras de moco (Corcuera y cols., 2005; Sánchez-Patán y cols., 2006). La hipersecreción de mucosa intestinal secundaria a la hipertensión portal podría tener también características defensivas para el organismo, en tanto que, componente de la barrera mucosa intestinal. Además las células caliciformes secretan en la luz intestinal péptidos que protegen el epitelio intestinal de la agresión y promueven su reparación (Blikslager y cols., 2007).

Estudios previos en un modelo de hipertensión portal prehepática en la rata, han demostrado que ketotifén reduce la presión portal, la concentración de quimasa (*rat mast cell protease* tipo II, RMCP-II) en los ganglios linfáticos mesentéricos y el número de células cebadas degranuladas en el ciego. En este experimento ketotifén, fue administrado por vía subcutánea incluido en microesferas de polímeros, el día previo a la producción de hipertensión portal y los animales fueron sacrificados a las 48 h de evolución postoperatoria (Sánchez-Patán y cols., 2008). Estos resultados sugieren que la profilaxis antiinflamatoria con ketotifén es eficaz respecto de algunas de las alteraciones precoces que produce la hipertensión portal.

Se ha considerado por algunos autores que el incremento inicial de la presión portal tras realizar la estenosis de la vena porta, podría tener unos efectos permanentes en el desarrollo de la hipertensión portal (Geraghty y cols., 1989). Esta hipótesis ha sido avalada por experimentos que demuestran que la administración de propranolol, clonidina y octreótido antes de realizar la ligadura parcial portal es capaz de prevenir algunas de las alteraciones de la hipertensión portal (Lee y cols., 1993; Lin y cols., 1996). Ulteriormente, al demostrarse la implicación de mecanismos inflamatorios en la producción del síndrome hipertensivo portal experimental (Aller y cols., 2005b) se ha pretendido demostrar la citada hipótesis mediante la administración, previa a la producción de hipertensión portal, de fármacos antiinflamatorios. Así, la administración profiláctica del corticosteroide budesonida, reduce el edema peripancreático retroperitoenal, el exudado peritoneal, la hipoproteinemia y la hipoalbuminemia precoz en ratas con ligadura estenosante portal (Vega de Ceniga y cols., 2003). Estos experimentos se realizaron en periodos evolutivos precoces, esto es entre 24 y 48 h del postoperatorio, ya que en esta fase aún no se ha desarrollado la circulación colateral porto-sistémica y, por tanto, la intensidad de la hipertensión portal es máxima. Sin embargo, el presente trabajo también sugiere que los efectos iniciales de la hipertensión portal pueden ser aminorados actuando sobre aquellos mecanismos inflamatorios que determinaron su cronicidad entre los que se

encontrarían los protagonizados por las células cebadas. Así, tras la producción de hipertensión portal la íntima asociación entre estas células inflamatorias y los epitelios y endotelios, las hacen elementos idóneos para desencadenar las alteraciones tanto iniciales como las que se producen a largo plazo, lo que explicaría su efecto terapéutico beneficioso tras su administración temporal una vez instaurada en toda su magnitud las complicaciones que son propias de la hipertensión portal.

Los resultados obtenidos demuestran el efecto beneficioso de ketotifén, con disminución de la presión portal, de la ascitis y de la hepatomegalia, asociada a una posible disminución de la fibrosis hepática asociada a este fármaco. Asimismo, esta acción terapéutica del ketotifén, permite ser atribuida a la inhibición del mecanismo patogénico que poseen las células cebadas, tanto en la producción de hipertensión portal y ascitis, como de fibrosis colestásica.

La actuación de ketotifén en la colestasis experimental también implicaría la modulación del eje sistema nervioso-célula cebada y, por lo tanto, de la inflamación neurogénica asociada a la hipertensión portal. Además, en el intestino la estimulación de los receptores nerviosos sensitivos y de las células inflamatorias incluyendo las células cebadas, es el origen de una información que se procesa en el sistema nervioso entérico. El resultado es la interpretación de las señales inflamatorias elaborando un comportamiento secretor y peristáltico que altera la flora bacteriana intestinal así como la función de la barrera intestinal (Sansonetti, 2008). Por lo tanto, ketotifén, por su acción antiinflamatoria, similar a la que se ha descrito en procesos alérgicos, podría reducir la degranulación de células cebadas intestinales, aminorando su componente inflamatorio neurogénico y ejerciendo una actividad defensiva de la barrera mucosa intestinal por un mecanismo neuroinmunológico central.

IL-10 descrita originalmente como un factor inhibidor de secreción, es producida por células T CD4⁺ y entre sus funciones principales destacan su capacidad para suprimir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como por ejemplo IL-2, TNF- α e interferon- γ (Pestka y cols., 2004). En la

actualidad, IL-10 se considera una citoquina con gran poder anti-inflamatorio. Esta capacidad para limitar la intensidad de la respuesta inmunológica se pretende utilizar con fines terapéuticos. Así, en procesos inflamatorios intestinales se considera que el aumento de la producción de IL-10 atenuaría la respuesta inflamatoria y protegería a la mucosa (Emami y cols., 2012). Sin embargo, en la hipertensión portal colestásica IL-10 aumenta en el íleon en tanto que disminuye en el hígado, en tanto que ketotifén no influye respecto de sus concentraciones espláncicas. Estos resultados no excluyen la acción anti-inflamatoria de ketotifén aplicada a IL-10 ya que dependiendo de la combinación existente entre esta interleuquina y otros mediadores de la respuesta Th2 como son IL-4 e IL-13, se obtendría dicho efecto. Por esta razón, quizá ketotifén reduce las concentraciones de IL-4 e IL-13 en el parénquima hepático. Asimismo, IL-22 una citoquina de la familia IL-10, ejerce una acción protectora contra los mediadores proinflamatorios en las respuestas inflamatorias intestinales, estimulando a las células epiteliales para que produzcan proteínas antibacterianas que protejan la barrera mucosa intestinal. Mediante estas funciones beneficiosas IL-22 se ha demostrado que contribuye a la mejoría de diversos tipos de colitis crónica experimental (Mizoguchi, 2012; Akdis, 2012).

Se podría considerar que en la hipertensión portal secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica, las células cebadas intestinales efectuarían un importante efecto patogénico en las distintas fases evolutivas de la enteropatía hipertensiva portal. En sus fases iniciales podrían participar en la producción de estasis vascular con hipoxia por redistribución del flujo sanguíneo en la pared intestinal y, en particular, en la mucosa y submucosa, ocasionando fenómenos de isquemia-revascularización que, a su vez, causarían estrés oxidativo y nitrosativo con edema intersticial, aumento de la expresión de quimioquinas y reclutamiento de leucocitos. A su vez, la respuesta inflamatoria intestinal favorecería el reclutamiento y proliferación de células cebadas con la subsiguiente producción de factores de crecimiento (TGF- β_1 y VEGF) que a largo plazo remodelarían la pared intestinal. A su vez en estadios avanzados persistiría la respuesta inflamatoria, si bien protagonizada por la angiogénesis que sería la causante

del gran desarrollo de la circulación colateral porto-sistémica, así como de la vasculopatía venosa mesentérica y de la angiopatía intestinal. En este caso, el tratamiento con ketotifén a partir de la sexta semana del postoperatorio, al reducir la respuesta inflamatoria crónica modularía este tipo de respuesta inflamatoria y en consecuencia aminoraría la remodelación intestinal y en particular, la angiogénesis característica de esta enteropatía y del resto de las complicaciones secundarias a este proceso proliferativo (Fernández y cols., 2005), favoreciendo así el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa intestinal, moderando la intensidad de la circulación hiperdinámica esplácnica y sistémica, reduciendo la circulación colateral y posiblemente la formación de ascitis (Fernández y cols., 2009). Los resultados del presente trabajo no excluyen el efecto beneficioso de las células cebadas en la patología intestinal secundaria a la colestasis extrahepática experimental. Por lo tanto, la acción anti-inflamatoria de ketotifén no excluye que actuando en subpoblaciones proinflamatorias de células cebadas, induzca la expresión de subpoblaciones inductoras de tolerancia y, por tanto, la tendencia a la resolución de la inflamación y la homeostasis.

La disminución del volumen ascítico en las ratas colestásicas tratadas con ketotifén, sugiere la existencia de un mecanismo inflamatorio mediado por células cebadas en la patogenia de la ascitis. La ascitis es una grave complicación de las hepatopatías (Dong, 2008; Gordon, 2012; Rahimi y Rockey, 2012). En las ratas con colestasis extrahepática se inicia a las 4 semanas del postoperatorio y se asocia a traslocación bacteriana intestinal con endotoxemia y respuesta inflamatoria sistémica (Assimakopoulos y Vagianos 2009). Ya que ha sido propuesta la hipótesis de la implicación de células cebadas en la producción de ascitis en la hipertensión portal experimental secundaria a colestasis extrahepática (Aller y cols., 2010e) en el presente trabajo se estudiaron las concentraciones de CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) e IL-13, en el líquido ascítico de las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica y su variación tras tratamiento con ketotifén. Los resultados demuestran que la estabilización de células

cebadas reduce las concentraciones de ambos mediadores en el líquido ascítico.

IL-13 desempeña una importante acción en la respuesta inmune mediada por células Th2 (Price y cols., 2010). Así, el incremento de IL-13 se ha descrito en sangre periférica, esputo y líquido de lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos (Brightling y cols. 2009). Aunque varios tipos de células pueden producir IL-13 en la respuesta inflamatoria de tipo 2, son las células cebadas su origen principal (Price y cols. 2010; Zhang y cols. 2010a). En las hepatopatías crónicas con fibrosis o cirrosis, IL-6 estimula la producción de IL-13 por células cebadas (Zhang y cols. 2010b; Wiest y cols. 2010). Por lo tanto, en las ratas con fibrosis hepática post-colestasis IL-6 podría estimular la liberación de IL-13 por células cebadas localizadas en la inmediación de vasos sanguíneos sub-mesoteliales. A su vez, la administración de ketotifén al estabilizar las células cebadas inhibiría su producción, así como su participación en la respuesta inflamatoria de tipo 2, causante de ascitis (Casella y cols., 2011).

CGRP también presenta elevadas concentraciones plasmáticas en pacientes con hepatopatías crónicas (Gupta y cols. 1992). Su incremento en el líquido ascítico de las ratas con colestasis y su disminución tras el tratamiento con ketotifén, sugiere que su producción podría estar protagonizada por células cebadas. Las células cebadas peritoneales pueden inducir la liberación de CGRP por los nervios sensitivos (Kaur y cols., 2009) favoreciendo el aumento de flujo sanguíneo peritoneal, el aumento de la permeabilidad vascular y, por último, el desarrollo de ascitis en las ratas colestásicas

La eficacia del tratamiento con ketotifén en la disminución de IL-13 y CGRP en el líquido ascítico de ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, sugiere que en la producción de la ascitis participarían las células mediante, quizá causando una respuesta inflamatoria mediada por células Th2. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el tratamiento con

estabilizadores de células cebadas podría constituir un tratamiento eficaz de la ascitis secundaria a insuficiencia hepática crónica e hipertensión portal.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental permiten concluir que el fármaco ketotifén ejerce un efecto beneficioso mediante su administración temporal en la hipertensión portal colestásica en periodos evolutivos avanzados. Ulteriores estudios serán necesarios para complementar los obtenidos y caracterizar con mayor precisión la participación de las células cebadas en la producción de patología esplácnica secundaria a colestasis extrahepática, aunque su remisión parcial tras el tratamiento temporal con ketotifén sugiere que desempeñan un papel protagonista, en cuyo caso el tratamiento con inhibidores de la degranulación y síntesis de mediadores pro-inflamatorios por las células cebadas puede ser en el futuro una solución terapéutica aplicable al ser humano.

VI. CONCLUSIONES

1. La colestasis extrahepática microquirúrgica experimental en la rata, se agrava a partir de la sexta semana del postoperatorio y empeora por tanto las alteraciones secundarias a la hipertensión portal asociada a la insuficiencia hepática crónica, como son la ascitis, la circulación colateral con vasculopatía venosa mesentérica, la hepatomegalia con fibrosis, la esplenomegalia y el hipogonadismo.
2. El tratamiento con ketotifén, un fármaco estabilizador de las células cebadas, en las ratas con colestasis desde la sexta semana de evolución postoperatoria reduce el grado de insuficiencia hepática, así como las complicaciones propias de este tipo de hipertensión portal colestásica, como son la ascitis, la esplenomegalia, la atrofia testicular, la circulación colateral portosistémica y la vasculopatía venosa mesentérica.
3. El incremento esplácnico de las concentraciones de proteína quimiotáctica de macrófagos, factor tumoral de necrosis y factor de crecimiento de endotelio vascular propio de las ratas con colestasis extrahepática se reduce mediante el tratamiento con ketotifén. Asimismo, este tratamiento disminuye las concentraciones hepáticas de interleuquina-4, interleuquina-13, interleuquina-17A y factor de crecimiento transformador beta.
4. El ketotifén, reduce en el líquido ascítico la concentración de interleuquina 13 y de péptido relacionado con el gen de la calcitonina, que son potenciales mediadores inflamatorios de las células cebadas.

5. Los efectos beneficiosos del tratamiento con ketotifén en la colestasis extrahepática experimental sugieren la implicación de las células cebadas en su patogenia y por lo tanto fundamentan ulteriores estudios para su aplicación a la clínica humana.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdeldayem H, Ghoneim E, Refaei AA, Abou-Gabal A. Obstructive jaundice promotes intestinal-barrier dysfunction and bacterial translocation: experimental study. *Hepatol Int.* 1: 444-8. 2007.
- Abounassif MA, El-Obeid HA, Gadkariem EA. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 36: 1011-18. 2005.
- Abrahám S, Szabó A, Kaszaki J, Varga R, Eder K, Duda E, Lázár G, Tiszlavicz L, Boros M, Lázár G Jr. Kupffer cell blockade improves the endotoxin-induced microcirculatory inflammatory response in obstructive jaundice. *Shock.* 30: 69-74. 2008.
- Abraldes JG, Pasarín M, García-Pagán JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 12:6577-84. 2006.
- Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks, a review. *Liver Transpl.* 16: 1016-32. 2010.
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 1101-10, 2008.
- Akdis CA. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. *Nat Med.* 18:736-49, 2012.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim.* 54: 155-61, 2005.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell-cell adhesion and the extracellular matrix. En: *Molecular biology of the cell*. Edit. Garland Publishing, Inc. New York. Chapter 12: 673-715, 1983.
- Albrecht M, Frungieri MB, Kunz L, Rämisch R, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cell Mol Life Sci.* 62: 2867-76, 2005.
- Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol.* 178: 175-86. 2011.
- Aller MA, Lorente L, Alonso S, Rodríguez G, Arias J. Different types of response to hepatic arterial ischemia in rats with cholestasis. *Surg Res. Commun* 14: 269-80, 1993a.

- Aller MA, Lorente L, Alonso S, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol* 28: 10-14, 1993b.
- Aller MA, Arias JL, Lorente L, Nava MP, Duran HJ, Arias J. Neuro-immune-endocrine functional system and vascular pathology. *Med Hypotheses* 57: 561-9, 2001.
- Aller MA, Arias JL, Nava MP, Arias J. Posttraumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune, and endocrine functional systems. *Exp Biol Med* (Maywood). 229: 170-81, 2004a.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery*. 24:442-7. 2004b.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Durán M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *Invest Surg*. 17:99-104. 2004c.
- Aller MA, Vara E, Garcia C, Palma MD, Arias JL, Nava MP, Arias J. Proinflammatory liver and antiinflammatory intestinal mediators involved in portal hypertensive rats. *Mediators Inflamm* 2:101-11. 2005.
- Aller MA, Nava MP, Lopez L, Mendez M, Mendez Lopez M, Arias J, Arias JI. *Hipertension Portal Experimental*. Editorial Complutense. Línea 300, 23:1-148, 2005b.
- Aller MA, Arias JL, Sanchez-Patan F, Arias J. The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit* 12: 225-34, 2006.
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model*. 4: 44-68. 2007a.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med*. 5: 44-58. 2007b.
- Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 1:6. 2008a.
- Aller MA, Ortega L, Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Cruz A, Losada M, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a histopathological liver study. *The Open Pathol J*. 2: 71-77. 2008b.

- Aller MA, Nava MP, Méndez M, Vergara P, Arias JL. Laboratory Rat Management. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers, 7-31. 2009a.
- Aller MA, Nava MP. Anesthesia, Analgesia and Postoperative Care. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers: 49-70. 2009.
- Aller MA, Prieto I, Cruz A, Losada M, Arias JI, García-Domínguez J, Argudo S, Arias JL, Arias J. Extrahepatic Cholestasis En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers, 137-156. 2009b.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JL, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int.*: 29:1132-40. 2009c.
- Aller MA, Arias J. Microsurgery: Instruments and Techniques En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers: 32-48. 2009.
- Aller MA, Mendez M, Mendez-Lopez M, Argudo S, Arias N, Lorente L, Arias JL, Arias J "Microsurgical techniques for researching liver diseases: A review". *Ann Gastroenterol Hepatol.* 1:101, 2010a
- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Arias J. A suitable microsurgical method for obstructive cholestasis in the rat. *Nature Protocols*. Protocols Network:http://www.natureprotocols.com/2010/07/22/a_suitable_microsurgical_metho.php; DOI: 10.1038/nprot.2010.56 ; 2010b
- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 22: 651-61. 2010c.
- Aller MA, García-Domínguez J, Vergara P, Arias J. Mast cells in wound-healing cholestatic liver response. *Burns.* 36:292-4. 2010d.
- Aller MA, Prieto I, Argudo S, de Vicente F, Santamaría L, de Miguel MP, Arias JL, Arias J. The interstitial lymphatic peritoneal mesothelium axis in portal hypertensive ascites: when in danger, go back to the sea. *Int J Inflamm* 2010e.
- Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest.* 81:569-78. 1988.
- Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology.* 35: 1256-68. 2002.
- AlvaroD, Alpini G, Jezequel AM y cols. Role and mechanisms of action of acetylcholine in.... Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C,

- Francia C, Fraioli F, Romeo R, Marucci L, Le Sage G, Glaser SS, Benedetti A: Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J Clin Invest.* 100:1349-1362. 1997.
- Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E, Marziani M, Francis H, Alpini G. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology.* 132: 415-31. 2007.
- Alving K, Sundstrom C, Matran R, Panula P, Hokfelt T, Lundberg JM. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res.* 264: 529-38. 1991.
- Aragónés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirkx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet.* 40:170-80. 2008.
- Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Viña J, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 301: G119-27. 2011.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer.* 104: 223-8. 2005.
- Arias JI, Aller MA, Sánchez-Patan F, Arias J. Inflammation and cancer: is trophism the link?. *Surg Oncol.* 15: 235-42, 2006.
- Arias JI, Aller MA, Arias J. Cancer cell: using inflammation to invade the host. *Mol Cancer.* 6:29, 2007.
- Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol.* 26: 1042-54, 1997.
- Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders?. *Exp Dermatol.* 8: 1-16, 1999.

- Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Patsoukis N, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats. *Acta Physiol Scand*. 180: 177-85. 2004.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg*. 31: 2023-32. 2007.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol*. 15: 121-3. 2009.
- Assimakopoulos SF, Konstantinou D, Georgiou C, Chroni E Metabolism of polyamines and oxidative stress in the brain of cholestatic rats. *Amino Acids*. 38: 973-4. 2010.
- Atamas SP, White B. The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 15: 772-7. 2003.
- Au SR, Au K, Saggars GC, Karne N, Ehrlich HP. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. *J Cell Biochem*. 100: 1170-7. 2007.
- Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci*. 52: 2601-9. 2007.
- Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News*. 168: 111-6. 2009.
- Azmaiparashvili E, Berishvili E, Kakabadze Z, Pilishvili O, Mikautadze E, Solomon R, Jangavadze M, Kordzaia D. Ductular reaction at the early terms of common bile duct ligation in the rats. *Acta Biol Hung*. 63: 321-32. 2012.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc*. 37: 141-8. 2004.
- Bachelet I, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Mast cells: not only in allergy. *Immunol Allergy Clin North Am*. 26: 407-25. 2006.
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 22:464-71. 2007.

- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 127: 243-9. 2000.
- Bassler D, Mitra A, Ducharme FM, Forster J. Ketotifen alone or as additional medication for longterm control of asthma and wheeze in children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 1.CD001384. 2004.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells*. 24: 153-66. 2007.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 115: 209-18. 2005.
- Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal*. 7: 1346-55. 2005.
- Bhattacharya A, Ghosal SK. Effect of hydrophobic permeation enhancers on the release and skin permeation kinetics from matrix type transdermal drug delivery system of ketotifen fumarate. *Acta Pol Pharm*. 58: 101-5. 2001.
- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol*. 23: 235. 1995.
- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol*. 24: 335-42. 1996.
- Bergasa NV, Rothman RB, Vergalla J, Xu H, Swain MG, Jones EA. Central mu-opioid receptors are down-regulated in a rat model of cholestasis. *J Hepatol*. 15:220-4. 1992.
- Bergasa NV, Jones EA. The pruritus of cholestasis: potential pathogenic and therapeutic implications of opioids. *Gastroenterology*. 108: 1582-8. 1995a.
- Bergasa NV, Alling DW, Talbot TL, Swain MG, Yurdaydin C, Turner ML, Schmitt JM, Walker EC, Jones EA. Effects of naloxone infusions in patients with the pruritus of cholestasis. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 123: 161-7. 1995b.
- Bergmeyer HU, Bowers GN, Horder M, Moss DW. IFCC method for aspartate aminotransferase. Appendix B. Conditions for the measurement of the catalytic concentrations of reagent enzymes and the contaminants. *Clin Chim Acta*. 70: F41-2. 1976.

- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem*. 24: 58-73. 1978.
- Bergmeyer HU, Horder M. International federation of clinical chemistry. Scientific committee. Expert panel on enzymes. IFCC document stage 2, draft 1; 1979-11-19 with a view to an IFCC recommendation. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem*. 18: 521-34. 1980.
- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Dubeau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 316: 592-600. 2006.
- Bernadich C, Bandi JC, Melin P, Bosch J. Effects of F-180, a new selective vasoconstrictor peptide, compared with terlipressin and vasopressin on systemic and splanchnic hemodynamics in a rat model of portal hypertension. *Hepatology*. 27: 351-356, 1998.
- Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol*. 31:185-205. 2009.
- Bischofs IB, Schwarz US: Cell organization in soft media due to active mechano sensing. *Proc Natl Acad Sci*. 100: 9274-9279. 2003.
- Bissell DM. Assessing fibrosis without a Liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology*. 127: 1847-9. 2004.
- Black DM, Behrns KE. A scientist revisits the atrophy-hypertrophy complex: hepatic apoptosis and regeneration. *Surg Oncol Clin N Am*. 11: 849-64. 2002.
- Blanco-Rivero J, Aller MA, Arias J, Ferrer M, Balfagón G. Long-term portal hypertension increases the vasodilator response to acetylcholine in rat aorta: role of prostaglandin I₂. *Clin Sci (Lond)*. 117: 365-74. 2009.
- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*. 87: 545-64. 2007.
- Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol*. 23: 299-305. 2007.
- Bogorad RL, Ostroukhova TY, Orlova AN, Rubtsov PM, Smirnova OV. Long isoform of prolactin receptor predominates in rat intrahepatic bile ducts and further increases under obstructive cholestasis. *J Endocrinol*. 188: 345-54. 2006.

- Bomzon A, Blendis LM. Vascular reactivity in experimental portal hypertension. *Am J Physiol*. 252: 158-62. 1987.
- Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernández M, García-Pagán JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am*. 21:1-14. 1992.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, Ridgway RA, Seo SS, Spee B, Van Rooijen N, Sansom OJ, Iredale JP, Lowell S, Roskams T, Forbes SJ. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med*. 18:572-9. 2012.
- Boyer JL. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol*. 46: 365-71. 2007.
- Brightling CE, Saha S, Hollins F. Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Exp Allergy*. 40: 42-9. 2010.
- Brunengraber H, Roe CR. Anaplerotic molecules: current and future. *J Inherit Metab Dis*. 29: 327-31. 2006.
- Bulmer AC, Ried K, Blanchfield JT, Wagner KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res*. 658: 28-41. 2008.
- Butcher MJ, Galkina EV. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol*. 3:44. 2012.
- Butterworth RF, Norenberg MD, Felipe V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT; Members of the ISHEN Commission on Experimental Models of HE. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int*. 29: 783-8. 2009.
- Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA . Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction . *J. Hepatol*. 40: 14-23. 2004.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 39: 273-8. 2004.
- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 5: 257-60. 2006.
- Carroll-Portillo A, Surviladze Z, Cambi A, Lidke DS, Wilson BS. Mast cell synapses and exosomes: membrane contacts for information exchange. *Front Immunol*. 3:46. 2012.

- Casella G, Villanacci V, Bassotti G. Eosinophilic ascites resolution with ketotifen. *Mayo Clin Proc.* 86: 1027. 2011.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Denef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 36: 200-9. 2002.
- Castañeda B, Dubernardi-Venon W, Bandi JC, Andreu V, Perez del Pulgar S, Moitinho E, Pizcueta P, Bosch J. The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology.* 31: 581-586. 2000.
- Caughey GH. Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol.* 716:212-34. 2011.
- Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood.* 101: 2973-82. 2003.
- Chan C-C, Wang S-S, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang MC, Lee SD: Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest.* 34: 290-296. 2004.
- Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 178: 439-48. 2011.
- Chen B, Fu B: A model for charged molecule transport in the interstitial space. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 1:55-58. 2005.
- Cheng CW, Duwaerts CC, Rooijen N, Wintermeyer P, Mott S, Gregory SH. NK cells suppress experimental cholestatic liver injury by an interleukin-6-mediated, Kupffer cell-dependent mechanism. *J Hepatol.* 54: 746-52. 2011.
- Chiang CH, Chen JL, Liu YT, Wang DP. Therapeutic effect and pharmacokinetics of ketotifen transdermal delivery system. *Drug Dev Ind Pharm.* 24: 213-7. 1998.
- Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology.* 50: 2007-13. 2009.
- Chu D, Adler DG. Malignant biliary tract obstruction: evaluation and therapy. *J Natl Compr Canc Netw.* 8: 1033-44. 2010.
- Claman HN. Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 16: 141-51. 1990.

- Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 7: 281-7. 2010.
- Cook JGH. Creatinine assay in the presence of protein. *Clin Chim Acta*. 32: 485-6. 1971.
- Corradi F, Brusasco C, Fernández J, Vila J, Ramirez MJ, Seva-Pereira T, Fernández-Varo G, Mosbah IB, Acevedo J, Silva A, Rocco PR, Pelosi P, Gines P, Navasa M. Effects of pentoxifylline on intestinal bacterial overgrowth, bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats with ascites. *Dig Liver Dis*. 44: 239-44. 2011.
- Corcuera Pindado MT, Nava Hidalgo MP, Angulo Burgos A, Aller Reyero MA, Gómez Aguado F, Casado Fariñas I, Alonso Martín MJ, Pérez AJ. Splanchnic remodeling secondary to experimental prehepatic portal hypertension. *An Med Interna*. 22: 317-22. 2005.
- Costa AMA, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmouliere A: Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchow Arch*. 442: 372-380. 2003.
- Crawford JM. Development of the intrahepatic biliary tree. *Semin Liver Dis*. 22: 213-26. 2002.
- Cuenca J, Martin-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Bosca L, Goren N: Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol*. 169: 1567-1576. 2006.
- Davis GE, Stratman AN, Sacharidou A, Koh W. Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. *Int Rev Cell Mol Biol*. 288: 101-65. 2011.
- Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, et al. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis*. 30:134-146. 2010.
- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol*. 26: 637-43. 2005.
- Day SA, Lakner AM, Moore CC, Yen MH, Clemens MG, Wu ES, Schrum LW. Opioid-like compound exerts anti-fibrotic activity via decreased hepatic stellate cell activation and inflammation. *Biochem Pharmacol*. 81: 996-1003. 2011.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can

- engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 19345-50. 2007.
- De Jonge WJ, The FO, van der Coelen D, Bennink RJ, Reitsma PH, van Deventer SJ, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology*. 127: 535-45. 2004.
- De Jonge WJ. Mast cells in intestinal inflammation, barrier function, and postoperative motility. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 53: 56-7. 2011.
- De Minicis S, Candelaresi C, Marzioni M, Saccomano S, Roskams T, Casini A, Risaliti A, Salzano R, Cautero N, di Francesco F, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. *Gut*. 57: 352-64. 2008.
- Deng YH, Pu CL, Li YC, Zhu J, Xiang C, Zhang MM, Guo CB. Analysis of biliary epithelial-mesenchymal transition in portal tract fibrogenesis in biliary atresia. *Dig Dis Sci*. 56: 731-40. 2011.
- De Vos R, Desmet VJ. Morphologic changes of the junctional complex of the hepatocytes in rat liver after bile duct ligation. *Br J Exp Pathol*. 59: 220-7. 1978.
- De Vries VC, Noelle RJ. Mast cell mediators in tolerance. *Curr Opin Immunol*. 22: 643-8. 2010.
- De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta*. 1822: 66-73. 2012 .
- Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a dual between dogma and myth. *J Hepatol*. 40: 860-7. 2004.
- Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch*. 458: 251-9. 2011.
- Desmoulière A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest*. 76: 765-78. 1997.
- Díaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG. Evidence for the epithelial to

- mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol.* 39: 102-15. 2008.
- Diehl AM. Neighborhood watch orchestrates liver regeneration. *Nat Med.* 18: 497-9. 2012.
- Diez-Arias JA, Aller MA, Palma MD, Arias JL, Muñiz E, Sánchez M, Arias J. Increased duodenal mucosa infiltration by mast cells in rats with portal hypertension. *Dig Surg.* 18: 34-40. 2001.
- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* 8: 445-54. 2004.
- Dold S, Laschke MW, Zhau Y Y, Schilling M, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte recruitment regulates hepatocellular damage in acute obstructive cholestasis in mice. *Inflamm Res.* 59: 291-8. 2010.
- Dong MH, Saab S. Complications of cirrhosis. *Dis Mon.* 54: 445-56. 2008.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293: G1134-46. 2007.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin estandars and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 31: 87-96. 1971.
- Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, Jendrzeczak B, McComb RB, Schaffer R, Hause LL. Candidate Reference Method for determination of total bilirubin in serum: Development and validation. *Clin Chem.* 31:1779-89. 1985.
- Egan CA, Rallis TM. Treatment of chronic urticaria with ketotifen. *Arch Dermatol.* 133: 147-9. 1997.
- Emami CN, Chokshi N, Wang J, Hunter C, Guner Y, Goth K, Wang L, Grishin A, Ford HR. Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Am J Surg.* 203: 428-35. 2012.
- Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol.* 670: 180-5. 2011.
- Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol.* 14: 5641-9. 2008.

- Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN: Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 59:1351-1365. 2007.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology.* 22: 1175-81. 1995.
- Fernández M, Mejías M, Angermayr B, García-Pagán JC, Rodés J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol.* 43: 98-103. 2005.
- Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol.* 50: 604-20. 2009.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol.* 58: 49-58. 2006.
- Foley TT, Siggers GC, Moyer KE, Ehrlich HP. Rat mast cells enhance fibroblast proliferation and fibroblast-populated collagen lattice contraction through gap junctional intercellular communications. *Plast Reconstr Surg.* 127: 1478-86. 2011.
- Folin O. Beitrag zur chemie des kreatinins und kreatins im hame. *Physiol Chem.* 41: 223-42. 1904.
- Ford AC, Talley NJ. IBS in 2010: advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8: 76-8. 2011.
- Frances R, Chiva M, Sánchez E, Gonzalez-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balazó J, Perez-Mateo M, Song X-Y, Guarner C, Such J: Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF- α monoclonal antibody administration in rats with cirrosis and ascites. *J Hepatol.* 46:797-803. 2007.
- Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci.* 51: 2248-56. 2006.
- Francis H, Meininger CJ. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Dig Liver Dis.* 42: 529-36. 2010.
- Friedman SL. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis is it all hype? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 4: 236-7. 2007.
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 88: 125-72. 2008.

- Fuschiotti P. Role of IL-13 in systemic sclerosis. *Cytokine*. 56: 544-9. 2011.
- Gallant-Behm CL, Hildebrand KA, Hart DA. The mast cell stabilizer ketotifen prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs. *Wound Repair Regen*. 16: 226-33. 2008.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 23: 749-86. 2005.
- Galli SJ, Grimbaldston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 8: 478-86. 2008.
- Galli SJ, Tsai M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci*. 49: 7-19. 2008.
- Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. 12: 1035-44. 2011.
- Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, Levi-Schaffer F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy*. 32: 237-46. 2002.
- García-Dominguez J, Aller MA, García C, de Vicente F, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Vara E, Arias J. Splanchnic Th(2) and Th(1) cytokine redistribution in microsurgical cholestatic rats. *J Surg Res*. 162: 203-12. 2010.
- García-Moreno y cols. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepatol Res*. 24: 275-281. 2002.
- García-Moreno LM, Conejo NM, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 38: 127-32. 2005.
- Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 18: 353-72. 2004.
- Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology*. 17: 1081-5. 1993.

- Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ, Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*. 110: 199-209. 1996.
- Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology*. 111: 1118-24. 1996.
- Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, Carpino G, Alpini G, Francis H, Glaser S, Alvaro D, Onori P. Cholangiocytes and blood supply. *World J Gastroenterol*. 12: 3546-52. 2006a.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 291: G307-17. 2006b.
- Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, Tracy TF Jr, Gregory SH. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology*. 130: 810-22. 2006.
- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology*. 38: 345-54. 2003.
- Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293: G1147-54. 2007.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg*. 95: 646-56. 2008.
- Geraghty JG, Angerson WJ, Carter DC. Portal venous pressure and portasystemic shunting in experimental portal hypertension. *Am J Physiol*. 257: G52-7. 1989.
- Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*. 138: 4569-83. 2011.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit*. 11: RA337-45. 2005.
- Gilles S, Zahler S, Welsch U, Sommerhoff CP, Becker BF. Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative

- stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res.* 60: 608-16. 2003.
- Glaser S, Francis H, Demorrow S, Lesage G, Fava G, Marzioni M, Venter J, Alpini G. Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol.* 12: 3523-36. 2006.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med.* 11: e7. 2009.
- Glaser SS, Onori P, Wise C, Yang F, Marzioni M, Alvaro D, Franchitto A, Mancinelli R, Alpini G, Munshi MK, Gaudio E. Recent advances in the regulation of cholangiocyte proliferation and function during extrahepatic cholestasis. *Dig Liver Dis.* 42: 245-52. 2010.
- Gordon FD. Ascites. *Clin Liver Dis.* 16(2):285-99. 2012.
- Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature.* 346: 274-276. 1990.
- Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM. Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs.* 40: 412-48. 1990.
- Greiner JV, Mundorf T, Dubiner H, Lonsdale J, Casey R, Parver L, Kapik BM, Shams NB, Abelson MB. Efficacy and safety of ketotifen fumarate 0.025% in the conjunctival antigen challenge model of ocular allergic conjunctivitis. *Am J Ophthalmology.* 136: 1097-1105. 2003.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol.* 6:7. 2007.
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 5:147-53. 2003.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology.* 38: 355-63. 2003.
- Gupta S, Morgan TR, Gordan GS. Calcitonin gene-related peptide in hepatorenal syndrome. A possible mediator of peripheral vasodilation? *J Clin Gastroenterol.* 14: 122-6. 1992.
- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabejdar-Maralani P, Shafaroodi H, Borhani AA, Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced

- arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol.* 499: 307-13. 2004.
- Hakansso A, Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients.* 3: 637-682. 2011.
- Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev.* 217:8-18. 2007.
- Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic Rat. *Hepatology.* 30: 1198-205. 1999.
- Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, Gehring S, Gregory SH, Tracy TF Jr. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery.* 138: 313-20. 2005.
- Harty MW, Muratore CS, Papa EF, Gart MS, Ramm GA, Gregory SH, Tracy TF Jr. Neutrophil depletion blocks early collagen degradation in repairing cholestatic rat livers. *Am J Pathol.* 176: 1271-81. 2010.
- Hart DA, Frank CB, Kydd AS, Ivie T, Sciore P, Reno C. Neurogenic, mast cell and gender variables in tendon biology: potential role in chronic tendinopathy. En: Muffuli N, Renstrom P, Leadbetter W, editors. *Tendinopathy: basic science and clinical management.* London: Springer-Verlag. 40-8. 2005.
- Harunari N, Armendariz R, Zhu KQ, Deubner H, Engrav LH, Muangman P, Carrouger GJ, Gibran NS. Comparison of collagen nodules and mast cells between human hypertrophic scar and thick scar in the female red duroc pig. *Wound Repair Regen.* 13: A27. 2005.
- Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300: G729-38. 2011.
- He H, Mennone A, Boyer JL, Cai SY. Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology.* 53: 548-57. 2011.
- He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 10: 309-18, 2004.
- Heathcote EJ. Diagnosis and management of cholestatic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 5: 776-82. 2007.

- Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)*. 112: 265-80. 2007.
- Henry RJ, Berkman S. Absorbance of various protein-free filtrates of serum. *Clin Chem*. 3: 711-5. 1957.
- Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirrubin. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition*. Edit. Elsevier Saunders. St.Louis. Missouri. USA. 1165 – 1208. 2006.
- Hildebrand KA, Zhang M, Salo PT, Hart DA. Post-traumatic elbow contractures are associated with elevations in mast cells and neuropeptides in the joint capsule. *Wound Repair Regen*. 15: A20. 2007.
- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology*. 139: 1481-96. 2010.
- Hoefs JC, Morgan T, Ilagan BJ. Testing beneficial therapy in human cirrhosis using animal models of cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 56: 929-30. 2011.
- Huang LT, Tiao MM, Tain YL, Chen CC, Hsieh CS. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res*. 65: 176-80. 2009.
- Huang LT, Chen CC, Sheen JM, Chen YJ, Hsieh CS, Tain YL. The interaction between high ammonia diet and bile duct ligation in developing rats: assessment by spatial memory and asymmetric dimethylarginine. *Int J Dev Neurosci*. 28: 169-74. 2010.
- Huang P, Liu D, Gan X, Zhang R, Gao W, Xia Z, Hei Z. Mast cells activation contribute to small intestinal ischemia reperfusion induced acute lung injury in rats. *Injury*. 43: 1250-6. 2012.
- Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci*. 10: 170-8. 2003.
- Huang YH, Wang PW, Tiao MM, Chou MH, Du YY, Huang CC, Chuang JH. Glucocorticoid modulates high-mobility group box 1 expression and Toll-like receptor activation in obstructive jaundice. *J Surg Res*. 170: e47-55. 2011.
- Hung CH, Suen JL, Hua YM, Chiang W, Chang HC, Chen CN, Jong YJ. Suppressive effects of ketotifen on Th1- and Th2-related chemokines of monocytes. *Pediatr Allergy Immunol*. 18: 478-84. 2007.

- Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol.* 4: 1873–80. 2004.
- Iida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. *Surgery.* 148: 477–89. 2010.
- Ikeda R, Michitaka K, Yamauchi Y, Matsui H, Onji M. Changes in gastrointestinal lymph and blood vessels in patients with cirrhotic portal hypertension. *J Gastroenterol.* 36: 689–95. 2001.
- Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 22: S87–92. 2007.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology.* 128: 138–46. 2005.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 20: 811–27. 2006.
- Ingoldby CJ, McPherson GA, Blumgart LH. Endotoxemia in human obstructive jaundice. Effect of polymyxin B. *Am J Surg.* 147: 766–71. 1984.
- Inoue K, Ogawa K, Okada J, Sugibayashi K. Enhancement of skin permeation of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug. *J Control Release.* 108: 306–18. 2005.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.* 117: 539–48. 2007.
- Ismail MH, Pinzani M. Reversal of hepatic fibrosis: pathophysiological basis of antifibrotic therapies. *Hepatic Medicine: Evidence and Research.* 3: 69–80. 2011.
- Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut.* 48: 548–57. 2001.
- Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, McKim SE, Parsons C, Rippe RA, Wheeler MD. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290: G1318–28. 2006.

- Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*. 43: S121-31. 2006.
- Izquierdo JM, Sotorrío P, Alvarez-Uría J, Estrada JM, Quirós A. Serum ASAT, ALAT, ALP, LD, GT, and CK determined in the Cobas-Bio centrifugal analyser by the methods of the Scandinavian Committee on Enzymes. *Scand J Clin Lab Invest*. 42: 173-6. 1982.
- Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol*. 26: 173-9. 2011.
- Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*. 44: 88-106. 2012.
- Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res*. 22: 869-77. 2002.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23: 435-61. 2007.
- Jones EA, Bergasa NV. Why the cholestasis patients itch? *Gut*. 38: 644-5. 1996.
- Jungfer B, Jansen T, Przybilla B, Plewig G. Solid persistent facial edema of acne: successful treatment with isotretinoin and ketotifen. *Dermatology*. 187: 34-7. 1993.
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology*. 31: 555-61, 2000.
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 281:G612-25. 2001.
- Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altioek M, Kamali G, Koculu S, Catay A, Kamali S, Karahan S. Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol*. 16: 4313-20. 2010.
- Kassel KM, Sullivan BP, Luyendyk JP. Lipopolysaccharide enhances transforming growth factor β 1-induced platelet-derived growth factor-B expression in bile duct epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 27: 714-21. 2012.

- Katsuta Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nippon Med Sch* 72: 217-25. 2005.
- Kaur R, O'Shaughnessy CT, Jarvie EM, Winchester WJ, McLean PG. Characterization of a calcitonin gene-related peptide release assay in rat isolated distal colon. *Arch Pharm Res*. 32: 1775-81. 2009.
- Kennett EC, Davies MJ. Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic Biol Med*. 42: 1278-89. 2007.
- Kershenobich SD, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol*. 2: 159-63. 2003.
- Kidd M, McKenzie SH, Steven I, Cooper C, Lanz R; Australian Ketotifen Study Group. Efficacy and safety of ketotifen eye drops in the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 87: 1206-11. 2003.
- Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg*. 195: 249-56. 2008.
- Kinet JP. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. *Immunol Rev*. 217: 5-7. 2007.
- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci*. 7: d496-503. 2002.
- Kischer CW, Bailey JF. The mast cell in hypertrophic scars. *Tex Rep Biol Med*. 30: 327-38. 1972.
- Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 59: 1213-21. 2010.
- Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, Kakar S, Yeh BM, Corvera CU. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice. *J Surg Res*. 164: 221-7. 2010.
- Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem*. 337: 77-81. 2010.

- Kojima K, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Chiba K. Microarray analysis of hepatic gene expression during long-term cholestasis induced by common bile duct ligation in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 115-116: 63-75. 2004.
- Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res*. 110: 174-89. 2012.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 12: 7413-20. 2006.
- Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Müller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 12: 1668-76. 2001.
- Konstantinidis K, Kitsis RN. Cardiovascular biology: Escaped DNA inflames the heart. *Nature*. 485: 179-80. 2012.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*. 65: 305-11. 1984.
- Kravetz D, Sikuler E, Groszmann RJ. Splanchnic and systemic hemodynamics in portal hypertensive rats during hemorrhage and blood volume restitution. *Gastroenterology*. 90: 1232-40. 1986.
- Kremer AE, Oude Elferink RP, Beuers U. Pathophysiology and current management of pruritus in liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 35: 89-97. 2011.
- Kroeger RJ, Groszmann RJ. Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model. *Hepatology*. 5: 97-101. 1985a.
- Kroeger RJ, Groszmann RJ. The effect of the combination of nitroglycerin and propranolol on splanchnic and systemic hemodynamics in a portal hypertensive rat model. *Hepatology*. 5: 425-30. 1985b.
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol*. 87: 343-59. 2006.
- Kupietzky A, Levi-Schaffer F. The role of mast cell-derived histamine in the closure of an in vitro wound. *Inflamm Res*. 45: 176-80. 1996.

- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 18: 65-70. 2003.
- Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis.* 30:125-133. 2010.
- Lamb E, Newman DJ, Price C.P. Kidney Function Test . En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition*. Edit. Elsevier Saunders. St Louis. Missouri. USA. 797-835. 2006.
- Larsen K. Creatinine assay in the presence of protein with LKB 8600 reaction rate analyser. *Clin Chim Acta.* 38: 475-6. 1972.
- Laschke MW, Dold S, Jeppsson B, Schilling MK, Menger MD, Thorlacius H. Rho-kinase inhibitor attenuates cholestasis-induced CXC chemokine formation, leukocyte recruitment, and hepatocellular damage in the liver. *J Surg Res.* 159: 666-73. 2010.
- Lautt WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc.* 42: 1662-6. 1983.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S, Dawson PA, LaRusso NF. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest.* 100: 2714-21. 1997.
- Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology.* 127: 1565-77. 2004.
- Le Bigot JF, Begue JM, Kiechel JR, Guillouzo A. Species differences in metabolism of ketotifen in rat, rabbit and man: demonstration of similar pathways in vivo and in cultured hepatocytes. *Life Sci.* 40: 883-90. 1987.
- Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats. *Gastroenterology.* 105: 1464-70. 1993.
- Lee KC, Yang YY, Huang YT, Lee FY, Hou MC, Lin HC, Lee SD. Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci.* 119: 45-55. 2010.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 25: 195-206. 2011.

- Lee YS, Vijayasingam S. Mast cells and myofibroblasts in keloid: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study. *Ann Acad Med Singapore*. 24: 902-5. 1995.
- Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology*. 17: 908-14. 1993.
- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis*. 24:21-42. 2004.
- Li WG, Hu SX, Xue BD, Jiang ZG, Huang ZQ. Observation of hepatohilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats. *Transplant Proc*. 39: 3424-8. 2007.
- Li T, Yang Z. Research progress of vasculopathy in portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 11: 6079-84. 2005.
- Lin HC, Yang MC, Hou MC, Li SM, Huang YT, Yu PC, Tsai YT, Lee SD. Effects of long-term administration of octreotide in portal vein-stenosed rats. *Hepatology*. 23: 537-43. 1996.
- Llamas MA, Aller MA, Marquina D, Nava MP, Arias J. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes increases in chronic portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci*. 55: 2244-54. 2010.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 38: 191-208. 2011.
- Lojek A, Cíž M, Pekarová M, Ambrožová G, Vašíček O, Moravcová J, Kubala L, Drábiková K, Jančinová V, Perečko T, Pečivová J, Mačičková T, Nosál R. Modulation of metabolic activity of phagocytes by antihistamines. *Interdiscip Toxicol*. 4: 15-9. 2011.
- López L, Begega A, Arias JL, Lorente L, Aller MA, Durán Poveda M, Arias J. Citocromo Oxidasa Hepática en Ratas con Colestasis Microquirúrgica y con Anastomosis Portocava. *Rev Esp Enferm Dig*. 91: 365-73. 1999.
- López y cols. Cytochrome oxidase activity in splanchnic organs of portal hypertensive rats. *Rev Esp Enf Dig*. 93: 800-805. 2001.
- Lorente y cols. Extrahepatic Biliary Anatomy in Wistar rats. *Surg Res Commun*. 17: 31-38. 1995.

- Lorente L, Aller MA, Arias J. Liver Anatomy En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific publishers: 99-107. 2009.
- Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*. 442: 997-1002. 2006.
- Ma F, Li Y, Jia L, Han Y, Cheng J, Li H, Qi Y, Du J. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF β /Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PLoS One*. 7: e35144. 2012.
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT1A receptor activation. *Br J Pharmacol*. 159:950-7. 2010.
- Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig. Liver Dis*. 42:409-418. 2010.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 11: 1696-701. 2006.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*. 43: 31-44. 2006.
- Mani AR, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour AR. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29: 905-8. 2002.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 11: 519-31. 2011.
- Marcel M, Leroy A. Clinical, celular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev*. 83: 337-376. 2003.
- Martin U, Roemer D. Ketotifen: a histamine release inhibitor. *Monogr Allergy*. 12: 145-9. 1977.
- Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta*. 13: 161-70. 1966.
- Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinzy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology*. 128: 121-37. 2005.

- Marzioni M, Fava G, Benedetti A. Nervous and Neuroendocrine regulation of the pathophysiology of cholestasis and of biliary carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 22: 3471-80. 2006.
- Marzioni M, Svegliati Baroni G, Alpini G, Benedetti A. Endogenous opioid peptides and chronic liver disease: from bedside to bench. *J Hepatol*. 46: 583-6. 2007.
- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol*. 158: 2079-88. 2001.
- Matsumoto Y, Niimoto S, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A, Torigoe K. Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 9: 360-6. 2002.
- Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol*. 94: 1923-32. 1999.
- Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver*. 20: 152-6. 2000.
- Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev*. 217: 304-28. 2007.
- Mihun ZM, Kuftinec J, Hofman H, Zinic M, Kajfez F. "Ketotifen," En: *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. 13, p.240, Elsevier, 1984.
- Minter RM, Fan MH, Sun J, Niederbichler A, Ipaktchi K, Arbabi S, Hemmila MR, Remick DG, Wang SC, Su GL. Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery*. 138: 236-45. 2005.
- Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, Wang T, Hu B, Arbabi S, Hemmila MR, Wang SC, Remick DG, Su GL. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296: G45-54. 2009.
- Mitchell C, Couton D, Couty JP, Anson M, Crain AM, Bizet V, Rénia L, Pol S, Mallet V, Gilgenkrantz H. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am J Pathol*. 174: 1766-75. 2009.

- Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. *Am J Pathol.* 158: 967-75. 2001.
- Mizoguchi A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm Bowel Dis.* 18: 1777-84. 2012.
- Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg.* 194: 731-39. 2002.
- Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitrergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology.* 13: 227-32. 2006.
- Mombeini T, Roushanzamir F, Jorjani M, Pourpak Z, Gaskari SA, Mehr SE, Dehpour AR. Alteration in specific opioid-receptor labeling on peripheral blood leukocytes of bile duct-ligated rat. *Pathophysiology.* 13: 111-7. 2006.
- Monument MJ, Hart DA, Befus AD, Salo PT, Zhang M, Hildebrand KA. The mast cell stabilizer ketotifen fumarate lessens contracture severity and myofibroblast hyperplasia: a study of a rabbit model of posttraumatic joint contractures. *J Bone Joint Surg Am.* 92: 1468-77. 2010.
- Monument MJ, Hart DA, Befus AD, Salo PT, Zhang M, Hildebrand KA. The mast cell stabilizer ketotifen reduces joint capsule fibrosis in a rabbit model of post-traumatic joint contractures. *Inflamm Res.* 61: 285-92. 2012.
- Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 3: 111-28. 2010.
- Moquillaza LM, Aller MA, Nava MP, Santamaría L, Vergara P, Arias J. Partial hepatectomy, partial portal vein stenosis and mesenteric lymphadenectomy increase splanchnic mast cell infiltration in the rat. *Acta Histochem.* 112: 372-82. 2010.
- Mori V, Bartoloni St Omer F. On the behavior of mast cells in experimental cholestatic hepatopathy caused by ligation of the common bile duct. *Arch De Vecchi Anat Patol.* 47: 1089-98. 1966.
- Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Barreau F, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L, Eutamene H. Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. *Shock.* 28: 118-24. 2007.

- Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact.* 193: 225-31. 2011.
- Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 54: 367-74. 2006.
- Moseley RH. Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis.* 3: 465-75. 1999.
- Moss, D. W., International and national views on methods for alkaline phosphatase activity measurements in the clinical laboratory. En: *Proceedings of the Second International Symposium on Clinical Enzymology*, N. W. Tietz, A. Weinstock, and D. O. Rodgerson, Eds., American Association for Clinical Chemistry, Washington, D.C., pp 41-50. 1976.
- Moyer KE, Saggars GC, Ehrlich HP. Mast cells promote fibroblast populated collagen lattice contraction through gap junction intercellular communication. *Wound Repair Regen.* 12: 269-75. 2004.
- Muddu AK, Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 695-714. 2007.
- Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini MR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol.* 411: 135-41. 2001.
- Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology.* 30: 934-43. 1999.
- Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology.* 14: 551-66. 1991.
- Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M. Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech.* 38: 552-70. 1997.
- Nelson L, Vergnolle N, D'Mello C, Chapman K, Le T, Swain MG. Endogenous opioid-mediated antinociception in cholestatic mice is peripherally, not centrally, mediated. *J Hepatol.* 44: 1141-9. 2006.
- Newton JL, Hollingsworth KG, Taylor R, El-Sharkawy AM, Khan ZU, Pearce R, Sutcliffe K, Okonkwo O, Davidson A, Burt J, Blamire AM,

- Jones D. Cognitive impairment in primary biliary cirrhosis: symptom impact and potential etiology. *Hepatology*. 2008;48:541-9.
- Ng SC. Systemic sclerosis. *Singapore Med J*. 33: 189-92. 1992.
- Nguyen DL, Juran BD, Lazaridis KN. Primary biliary cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 24: 647-54. 2010.
- Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch*. 453:643-659. 2007.
- Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut*. 53: 438-45. 2004.
- O'Connor MJ. Mechanical biliary obstruction. A review of the multisystemic consequences of obstructive jaundice and their impact on perioperative morbidity and mortality. *Am Surg*. 51: 245-51. 1985.
- Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci*. 101: 24-30. 2006.
- Oguz S, Kanter M, Erboga M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol*. 43: 151-9. 2012.
- Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol*. 17: 155-62. 1993.
- Olds RJ, Olds JR. *A colour atlas of the rat- dissection guide*. Edit. Wolfe Medical Publications LTD. London. UK. 51. 1979.
- O'Leary, Jacqueline G; Pratt, Daniel S. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Current Opinion in Gastroenterology*. 23: 232-6. 2007.
- Oliva A, Multigner L. Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril*. 85: 240-3. 2006.
- Omenetti A, Yang L, Li YX, McCall SJ, Jung Y, Sicklick JK, Huang J, Choi S, Suzuki A, Diehl AM. Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Lab Invest*. 87: 499-514. 2007.

- Omenetti A, Popov Y, Jung Y, Choi SS, Witek RP, Yang L, Brown KD, Schuppan D, Diehl AM. The hedgehog pathway regulates remodelling responses to biliary obstruction in rats. *Gut*. 57: 1275-82. 2008.
- Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest*. 118: 3331-42. 2008.
- Omenetti A, Yang L, Gainetdinov RR, Guy CD, Choi SS, Chen W, Caron MG, Diehl AM. Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300: G303-15. 2011.
- O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery*. 122: 281-6. 1997.
- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdés E. Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol*. 28: 525-9. 1997.
- O'Sullivan M. Therapeutic potential of ketotifen in irritable bowel syndrome (IBS) may involve changes in mast cells at sites beyond the rectum. *Gut*. 60: 423. 2011.
- Oude Elferink RP, Kremer AE, Beuers U. Mediators of pruritus during cholestasis. *Curr Opin Gastroenterol*. 27:289-93. 2011.
- Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology*. 123: 1667-76. 2002.
- Pakarinen MP, Rintala RJ. Surgery of biliary atresia. *Scand J Surg*. 100: 49-53. 2011.
- Palma MD, Aller MA, Vara E, Nava MP, Garcia C, Arias-Diaz J, Balibrea JL, Arias J. Portal hypertension produces an evolutive hepato-intestinal pro- and anti-inflammatory response in the rat. *Cytokine*. 31: 213-26. 2005.
- Panteghini M, Bais R, W.van Solinge W. Enzymes. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis Fourth Edition*. Edit. Elsevier Saunders St Louis. Missouri. USA. 597 – 643. 2006.
- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks

- transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology*. 135: 660-70. 2008.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 22: 929-79. 2004.
- Peters T Jr. Proposals for standardization of total protein assays. *Clin Chem*. 14: 1147-59. 1968.
- Phillips MJ, Poucell S, Patterson J, Valencia P. The Liver. En: *An Atlas and Text of Ultrastructural Pathology*. New York: Raven Press, 1-35. 1987.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 21: 49-98. 2000.
- Popper H, Kent G, Stein R. Ductular cell reactions in the liver in hepatic injury. *J Mt Sinai Hosp NY*. 24: 551-6. 1957.
- Popov Y, Sverdlov DY, Bhaskar KR, Sharma AK, Millonig G, Patsenker E, Krahenbuhl S, Krahenbuhl L, Schuppan D. Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 298: G323-34. 2010.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G, Palasciano G. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 42: 1381-91. 2007.
- Poupon R, Poupon RE. Treatment of primary biliary cirrhosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 14: 615-28. 2000.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol*. 32: 129-40. 2000.
- Póvoa P, Ducla-Soares J, Fernandes A, Palma-Carlos AG. A case of systemic mastocytosis; therapeutic efficacy of ketotifen. *J Intern Med*. 229: 475-7. 1991.
- Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Easley CJ, Erle DJ, Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107: 11489-94. 2010.
- Prieto I, Aller MA, Santamaría L, Nava MP, Madero R, Pérez-Robledo JP, Arias J. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the small bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*. 20: 1025-31. 2005.

- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol*. 6:1. 2007.
- Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 43: S54-62. 2006.
- Rahimi RS, Rockey DC Complications of cirrhosis. *Curr Opin Gastroenterol*. 28: 223-9. 2012.
- Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest*. 84: 153-9. 2004a.
- Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology*. 127: 997-1000. 2004b.
- Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver*. 20: 387-96. 2000.
- Ramos L, Peña G, Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Mast cell stabilization improves survival by preventing apoptosis in sepsis. *J Immunol*. 185: 709-16. 2010.
- Repchinsky C, Welbanks L, Bisson R, Dang T, Fortin K, Jovaisas B, et al, editors. *Compendium of pharmaceuticals and specialties: the Canadian drug reference for health professionals*, 2006. Ottawa, Ont: Canadian Pharmacists Association; 2006.
- Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med*. 11: 176-205. 2007.
- Rioux KP, Sharkey KA, Wallace JL, Swain MG: Hepatic mucosal mast cell hyperplasia in rats with secondary biliary cirrhosis. *Hepatology*. 23: 888-895. 1996.
- Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology*. 112: 269-79. 1997.
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis*. 10: 459-79. 2006.
- Rodriguez J. Anestesia. En: *Trasplante experimental de órganos*. Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. Eds. Garsi SA, Madrid. 65-68. 1989.

- Rodríguez-Garay EA. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann Hepatol.* 2: 150-8. 2003.
- Royer M, Dubin M, Kravetz D. Evaluation of the Malloy-Evelyn and Jendrassik-Cleghorn methods for the determination of plasma bilirubin. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 5: 167-73. 1973.
- Rutherford AE, Pratt DS. Cholestasis and cholestatic syndromes, *Curr Opin Gastroenterol.* 22: 209-14. 2006.
- Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology.* 118: 1157-68. 2000.
- Sakamoto T, Kamijima M, Miyake M. Neurogenic airway microvascular leakage induced by toluene inhalation in rats. *Eur J Pharmacol.* 685: 180-5. 2012.
- Samson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC Study Group on urea candidate reference method. *Clin Chem.* 26: 816-26. 1980.
- Sánchez-Patán F, Aller MA, Corcuera MT, Vara E, Casado I, Gómez F, García C, Alonso MJ, Arias J. Chronic inflammatory portal hypertensive enteropathy in the rat. *Cir Esp.* 80: 162-7. 2006.
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Corcuera MT, Casado I, Gómez-Aguado F, Aller MA, Cruz A, Alonso MJ, Arias J. Biliary fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery.* 28: 361-6. 2008a.
- Sánchez-Patán F, Aller MA, Cuellar C, Rodero M, Corcuera MT, Nava MP, Gómez F, Blanco MD, Guerrero S, Anchuelo R, Muñiz E, Alonso MJ, Teijón JM, Arias J. Mast cell inhibition by ketotifen reduces splanchnic inflammatory response in a portal hypertension model in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 60: 347-55. 2008b.
- Sansonetti PJ. Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin Gastroenterol.* 24: 435-9. 2008.
- Sarchio SN, Kok LF, O'Sullivan C, Halliday GM, Byrne SN. Dermal mast cells affect the development of sunlight-induced skin tumours. *Exp Dermatol.* 21: 241-8. 2012.
- Sastre E, Balfagón G, Revuelta-López E, Aller MÁ, Nava MP, Arias J, Blanco-Rivero J. Effect of short- and long-term portal hypertension

- on adrenergic, nitrenergic and sensory functioning in rat mesenteric artery. *Clin Sci (Lond)*. 122: 337-48. 2012.
- Saxena R, Theise ND, Crawford JM. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces. *Hepatology*. 30: 1339-46. 1999.
- Scandinavian Committee on Enzymes . *Scand J Clin Lab Invest*. 33: 287-306. 1976.
- Schaffner F, Popper H: Classification and mechanism of cholestasis. In: *Liver and biliary disease. Pathophysiology. Diagnosis. Management*. London. Edited by Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH: W.B. Saunders Company Ltd. 296-323. 1979.
- Schoch C. In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther*. 19: 75-81. 2003.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 40: 725-33. 2002.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. 40: 734-8. 2002.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of

- catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med.* 40: 734-8. 2002.
- Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Ferard G, Gella FJ, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kytzia HJ, Lessinger JM, Miller WG, Nagel R, Pauwels J, Schimmel H, Siekmann L, Weidemann G, Yoshida K, Ceriotti F. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. *Clin Chem Lab Med.* 44: 1146-55. 2006.
- Schwarzer G, Bassler D, Mitra A, Ducharme FM, Forster J. Ketotifen alone or as additional medication for long-term control of asthma and wheeze in children. *Cochrane Database Syst Rev.* (1): CD001384. 2004.
- Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D: Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol.* 158: 1239-1244. 2001.
- Sekirov I, Russell S, Antunes RE, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 90: 859-904. 2010.
- Serna H, Porras M, Vergara P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 319: 1104-11. 2006.
- Sherlock S: Cholestasis. In: *Diseases of the liver and biliary System.* 8^o Edition. Edited by: Sherlock S. London: Blackwell Scientific Publications; 248-272. 1989.
- Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system.* 10th Edition. Blackwell Science Ltd. Oxford. 201-216. 1997.
- Shiha G, Sarin SK, Ibrahim AE, Omata M, Kumar A, Lesmana LA, Leung N, Tozun N, Hamid S, Jafri W, Maruyama H, Bedossa P, Pinzani M, Chawla Y, Esmat G, Doss W, Elzanaty T, Sakhuja P, Nasr AM, Omar A, Wai CT, Abdallah A, Salama M, Hamed A, Yousry A, Waked I, Elsaahar M, Fateen A, Mogawer S, Hamdy H, Elwakil R. Liver fibrosis: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). *Hepatol Int.* 3: 323-33. 2009.
- Shivakumar P, Campbell KH, Sabla GE, Miethke A, Tiao G, McNeal MM, Ward RL, Bezerra JA: Obstructive of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest.* 114: 322-329. 2004.

- Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Hernandez-Perez E, Huang J, Li Y-X, Rojkind M, Diehl AM: Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 291: G575-G583. 2006.
- Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest*. 90: 1447-56. 2010.
- Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol*. 248: G618-25. 1985.
- Sikuler E, Groszmann RJ. Hemodynamic studies in long- and short-term portal hypertensive rats: the relation to systemic glucagon levels. *Hepatology*. 6: 414-8. 1986.
- Skold CM, Ohkuni Y, Liu XD, Numerof R, Rennard SI. Cocultured human mast cells stimulate fibroblast-mediated contraction of collagen gels. *Inflammation*. 25: 47-51. 2001.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology*. 99: 466-77. 1990.
- Snoek SA, Dhawan S, van Bree SH, Cailotto C, van Diest SA, Duarte JM, Stanisor OI, Hilbers FW, Nijhuis L, Koeman A, van den Wijngaard RM, Zuurbier CJ, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterol Motil*. 24: 172-e91. 2012.
- Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology*. 105: 178-87. 1993.
- Sorinson SN, Il'icheva KV, Tsybasova AI. Current diazo-methods for the determination of bilirubin (100th anniversary of Hijmans van den Bergh). *Lab Delo*. 3: 143-7. 1971.
- Soylu AR, Aydogtu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Galoglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K: Antioxidants vitamins E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary obstructed rats. *World J Gastroenterol*. 12: 6835-6841. 2006.

- Spataro AC, Bosmann HB. Mechanism of action of disodium cromoglycate--mast cell calcium ion influx after a histamine-releasing stimulus. *Biochem Pharmacol.* 25: 505-10. 1976.
- Strazzabosco M, Spirlí C, Okolicsanyi L. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol.* 15: 244-53. 2000.
- Sugihara A, Tsujimura T, Fujita Y, Nakata Y, Terada N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. *J Hepatol.* 30: 859-67. 1999.
- Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis.* 27: 339-50. 2007.
- Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J.* 23: 752-8. 2004.
- Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P: Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 20: 1538-1544. 2005.
- Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci.* 52: 3348-54. 2007.
- Takeshita A, Shibayama Y. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Exp Toxicol Pathol.* 56: 273-80. 2005.
- Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 82: 258-66. 2006.
- Tarrats N, Moles A, Morales A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Marí M. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis. *Hepatology.* 54: 319-27. 2011.
- Thabut D, Tzai KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller M, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guicharo C, Ogier-Denis E, Poynard T, Moureau R, Le Brec D: High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology.* 46: 1893-1906. 2007.

- The FO, Bennink RJ, Ankum WM, Buist MR, Busch OR, Gouma DJ, van der Heide S, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE. Intestinal handling-induced mast cell activation and inflammation in human postoperative ileus. *Gut*. 57: 33-40. 2008.
- The FO, Buist MR, Lei A, Bennink RJ, Hofland J, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ, Boeckxstaens GE. The role of mast cell stabilization in treatment of postoperative ileus: a pilot study. *Am J Gastroenterol*. 104: 2257-66. 2009.
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*. 30: 1425-33. 1999.
- Theoharides TC, Bondy PK, Tsakalos ND, Askenase PW. Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature*. 297: 229-31. 1982.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1822: 21-33. 2012.
- Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: what is unique about the liver. *J Autoimmun*. 34: 1-6. 2010.
- Tietz, N. W., Bayse, D. D., Copeland, W., et al., Selection of reaction conditions for the measurement of alkaline phosphatase activity. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Clinical Enzymology*, A. Weinstock, N. W. Tietz, and D. O. Rodgerson, Eds., American Association for Clinical Chemistry, Washington, D.C., 51-66. 1976.
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. International Federation of Clinical Chemistry. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). IFCC Document Stage 2, Draft 1, 1983-03 with a view to an IFCC Recommendation. *Clin Chim Acta*. 135: 339F-367F. 1983.
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem*. 21: 731-48. 1993.
- Toki F, Takahashi A, Suzuki M, Ootake S, Hirato J, Kuwano H. Development of an experimental model of cholestasis induced by

- hypoxic/ischemic damage to the bile duct and liver tissues in infantile rats. *J Gastroenterol*. 46: 639-47. 2011.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 339: 1217-27. 1998.
- Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovoalbumina in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*. 22: e34-43. 2010.
- Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis*. 10: 56-65. 1990.
- Valent P, Sillaber C, Baghestanian M, Bankl HC, Kiener HP, Lechner K, Binder BR. What have mast cells to do with edema formation, the consecutive repair and fibrinolysis? *Int Arch Allergy Immunol*. 115: 2-8. 1998.
- Van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol*. 44: 947-55. 2006.
- Van Diest SA, Stanisor OI, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, van den Wijngaard RM. Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception. *Biochim Biophys Acta*. 1822: 74-84. 2012.
- Van Nassauw L, Adriaensen D, Timmermans JP. The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci*. 133: 91-103. 2007.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn C, van Loo D, Van Hoorebeke L, Segers P, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest*. 90: 1558-72. 2010.
- Vega De Céniga M, Valdés F, Aller MA, Nava MP, Chivato T, Arias J. Budesonide ameliorates early portal hypertension in the rat: possible antiexudative splanchnic action. *Inflammopharmacology*. 11: 211-22. 2003.
- Vítek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem*. 43: 1-57. 2007.
- Vliagoftis H, Befus AD. Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunol Rev*. 206: 190-203. 2005.

- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol.* 244: G52-7. 1983.
- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology.* 87: 1120-6. 1984.
- Wakabayashi Y, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Mechanism of neutrophil accumulation in sinusoids after extrahepatic biliary obstruction. *Hepatogastroenterology.* 55: 1179-83. 2008.
- Walker M, Harley R, LeRoy EC. Ketotifen prevents skin fibrosis in the tight skin mouse. *J Rheumatol.* 17: 57-9. 1990.
- Wang H, Vohra BP, Zhang Y, Heuckeroth RO. Transcriptional profiling after bile duct ligation identifies PAI-1 as a contributor to cholestatic injury in mice. *Hepatology.* 42: 1099-108. 2005.
- Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol.* 560: 61-8. 2007.
- Wang J, Shi GP. Mast cell stabilization: novel medication for obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 27: 919-24. 2011.
- Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 30: 215-25. 2010.
- Wasmuth HE, Weiskirchen R. [Pathogenesis of liver fibrosis: modulation of stellate cells by chemokines]. *Z Gastroenterol.* 48: 38-45. 2010.
- Waynforth HB, Flecknell PA. Anaesthesia and postoperative care. In: Waynforth HB, Flecknell PA, editors. *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* London. Elsevier Academic Press. 100-152. 2004.
- Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol.* 61: 233-45. 1997.
- White JR, Ishizaka T, Ishizaka K, Sha'afi R. Direct demonstration of increased intracellular concentration of free calcium as measured by quin-2 in stimulated rat peritoneal mast cell. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81: 3978-82. 1984.

- Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 17: 397-425. 2003.
- Wiest R, Weigert J, Wanninger J, Neumeier M, Bauer S, Schmidhofer S, Farkas S, Scherer MN, Schäffler A, Schölmerich J, Buechler C. Impaired hepatic removal of interleukin-6 in patients with liver cirrhosis. *Cytokine*. 53: 178-83. 2011.
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol*. 20: 68-74. 2008.
- Woerly G, Loiseau S, Loyens M, Schoch C, Capron M. Inhibitory effects of ketotifen on eotaxin-dependent activation of eosinophils: consequences for allergic eye diseases. *Allergy*. 58: 397-406. 2003.
- Wong BW, Kuchnio A, Bruning U, Carmeliet P. Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem Sci*. 2012
- Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci*. 12: 94-101. 1989.
- Woolf GM, Vierling JM. Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanisms. *Semin Liver Dis*. 13: 261-75. 1993.
- Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 208: 1339-50. 2011.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol*. 12: 3553-63. 2006.
- Xia X, Demorrow S, Francis H, Glaser S, Alpini G, Marzioni M, Fava G, Lesage G. Cholangiocyte injury and ductopenic syndromes. *Semin Liver Dis*. 27: 401-12. 2007.
- Xu JM, Shi GP. Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases. *Endocr Rev*. 33: 71-108. 2012.
- Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*. 411: 1570-9. 2010.
- Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol*. 23: 415-20. 2011.
- Yamashiro M, Kouda W, Kono N, Tsuneyama K, Matsui O, Nakanuma Y. Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary

- disorders. *An immunohistochemical study. Virchows Arch.* 433: 471-9. 1998.
- Yang Y-Y, Lee K-C, Huang Y-T, Wang Y-W, Hou M-C, Lee F-Y. Effects of N-acetylcysteine administration in hepatic microcirculation of rats with biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 49:25-33. 2008.
- Yang H, Li TW, Peng J, Tang X, Ko KS, Xia M, Aller MA. A Mouse Model of Cholestasis-Associated Cholangiocarcinoma and Transcription Factors Involved in Progression. *Gastroenterology.* 141: 378-388. 2011.
- Yang YY, Lee TY, Huang YT, Chan CC, Yeh YC, Lee FY, Lee SD, Lin HC. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) determines the improvement of hepatic endothelial dysfunction by vitamin E in cirrhotic rats. *Liver Int.* 32: 48-57. 2012.
- Yukselen V, Karaoglu AO, Ozutemiz O, Yenisey C, Tuncyurek M. Ketotifen ameliorates development of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Pediatr Surg Int.* 20: 429-33. 2004.
- Yung S, Chan TM: Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Perit Dial Int.* 27: S104-109. 2007.
- Zandieh A, Payabvash S, Pasalar P, Morteza A, Zandieh B, Tavangar SM, Dehpour AR. Gadolinium chloride, a Kupffer cell inhibitor, attenuates hepatic injury in a rat model of chronic cholestasis. *Hum Exp Toxicol.* 30: 1804-10. 2011.
- Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 24: 5764-74. 2005.
- Zhang H, Lin L, Yang H, Zhang Z, Yang X, Zhang L, He S. Induction of IL-13 production and upregulation of gene expression of protease activated receptors in P815 cells by IL-6. *Cytokine.* 50: 138-45. 2010a.
- Zhang L, Oh SY, Wu X, Oh MH, Wu F, Schroeder JT, Takemoto CM, Zheng T, Zhu Z. SHP-1 deficient mast cells are hyperresponsive to stimulation and critical in initiating allergic inflammation in the lung. *J Immunol.* 184: 1180-90. 2010b.
- Zhang J, Shi GP. Mast cells and metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 1822: 14-20. 2012.
- Zimmermann A, Zhao D, Reichen J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J Hepatol.* 30: 646-52. 1999.

Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*. 17: 3751-68. 2010.

Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 289: G798- G805. 2005.

Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis*. 12: 1-26, VII. 2008.

Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol*. 28: 445-89. 2010.